

FAGNA AMORIM DE OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS EM ESTIRPES
DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA**

CURITIBA

2011

FAGNA AMORIM DE OLIVEIRA

**CARACTERÍSTICAS DE VIRULÊNCIA E SUSCEPTIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS EM ESTIRPES
DE *Escherichia coli* UROPATOGÊNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^ª Dra. Cyntia M.T. Fadel Picheth

Co-orientadora: Prof^ª Dra. Kátia Sabrina Paludo

CURITIBA

2011

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter cumprido em mim os seus propósitos.

À Prof. Cyntia, pela oportunidade de realização deste trabalho, confiança em mim depositada, disponibilidade, orientação e sugestões tão valiosas em todos os momentos deste trabalho.

À Prof. Kátia, por ter contribuído de maneira ativa no delineamento deste trabalho.

À Lavínia, pela disponibilidade no fornecimento dos isolados bacterianos.

Aos meus pais, pelo incentivo em toda a minha formação profissional.

Às amigas do laboratório, pelo companherismo, momentos de descontração e ensinamento mútuo.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Escherichia coli uropatogênica (UPEC) é o principal patógeno urinário. Neste trabalho a presença de 8 fatores de virulência associados com UPEC foi pesquisada em 204 isolados clínicos de *E. coli* recuperados de cultura de urina em contagem $\geq 10^5$, o que representa bacteriúria significativa de infecção urinária. As bactérias foram classificadas em dois grupos de acordo com o número de leucócitos presentes nas amostras de urina das quais foram isoladas: grupo 1 (< 8 leucócitos/campo) com 104 estirpes, e grupo 2 (≥ 8 leucócitos/campo) com 100 estirpes. Dois sistemas de PCR multiplex foram utilizados para verificar a presença dos genes que codificam as adesinas P (*pap*), S (*sfa*) e adesina afimbrial I (*afaI*); o sideróforo aerobactina (*aer*); as toxinas alfa-hemolisina (*hly*) e fator necrotizante citotóxico tipo 1 (*cnf1*); PAI, marcador para a ilha de virulência identificada na estirpe nefritogênica CFT072; e *traT* associado com a resistência ao soro. A presença de CVD432, um marcador de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), também foi pesquisada entre as *E. coli* isoladas de urina por PCR. O perfil de susceptibilidade das estirpes de *E. coli* foi determinada pelo método de disco-difusão. Noventa por cento das UPEC apresentaram ao menos um dos genes de virulência pesquisados, sendo a prevalência *traT* (76%), *aer* (41%), PAI (32%), *sfa* (26%), *pap* (25%), *cnf1* (18%), *afa* (6%) e *hly* (5%). Não houve diferença significativa na distribuição desses genes entre os grupos 1 e 2. Maior grau de virulência foi detectado nas UPEC do grupo 2, enquanto estirpes com apenas 1 gene de virulência predominam no grupo 1. O gene CVD432 não foi detectado em nenhuma das UPEC analisadas, entretanto no ensaio de adesão em células HeLa 11 estirpes apresentaram o padrão de aderência agregativa característica daquele patógeno intestinal. Nas bactérias isoladas de outros sítios anatômicos, 79,2% apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência urinários, sendo *traT* e *aer* os mais frequentes, presentes em 70,1 % e 33,8% das estirpes, respectivamente. Cento e vinte estirpes de UPEC (58,8%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e ácido nalidíxico as drogas às quais estas apresentaram maior índice de resistência.

ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the major pathogen urinary. In this work the presence of eight virulence factors associated with UPEC was investigated in 204 clinical isolates of *Escherichia coli* recovered from urine cultures in counts $\geq 10^5$, which represents significant bacteriuria associated with urinary tract infection. The bacteria were classified into two groups according to the number of leukocytes present in urine samples from which they were isolated: group 1 (<8 WBC) with 104 strains, and group 2 (≥ 8 WBC) with 100 strains. Two multiplex PCR systems were used to verify the presence of genes encoding adhesins P (*pap*), S (*sfa*) and afimbrial adhesin I (*afa*), the siderophore aerobactin (*aer*); toxins alpha-hemolysin (*hly*) and cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*); PAI marker for virulence island identified in strain CFT072, and *traT* associated with serum resistance. The presence of CVD432, a marker of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) was also investigated among *E. coli* isolated from urine, by PCR. The susceptibility profile of strains of *E. coli* was determined by disk diffusion method. Ninety percent of UPEC showed at least one of the virulence genes studied, the prevalence being *traT* (76%), *aer* (41%), PAI (32%), *sfa* (26%), *pap* (25%), *cnf1* (18%), *afa* (6%) and *hly* (5%). There was no significant difference in the distribution of virulence genes between groups 1 and 2. Higher degree of virulence was detected in UPEC group 2, where strains carrying 4 or more virulence genes predominate; while strains with only one virulence gene predominate in group 1. The CVD432 gene was not detected in any of the UPEC analyzed, however in the adhesion test in HeLa cells 11 strains showed the aggregative adherence pattern characteristic of those intestinal pathogen. In bacteria isolated from other anatomical sites, 79.2% had at least one of the virulence factors tested, *aer* and *traT* being the most frequent, present in 70.1% and 33.8% of the strains, respectively. One hundred and twenty UPEC strains (58,8%) were resistant to at least one of the antimicrobials tested; ampicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole and nalidixic acid were the drugs to which they presented higher rates of resistance.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - INICIADORES UTILIZADOS PARA A AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM UPEC	23
TABELA 2 - PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR-MULTIPLEX	23
TABELA 3 - PROGRAMA UTILIZADO PARA PCR PARA CVD432	24
TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM ESTIRPES DE UPEC	30
TABELA 5 - FREQUÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA NAS ESTIRPES DE UPEC	33
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA EM ESTIRPES DE <i>E. coli</i> ISOLADAS DE OUTRAS REGIÕES ANATÔMICAS ..	35
TABELA 7 - FREQUÊNCIA DOS GENES DE VIRULÊNCIA DETECTADOS POR PCR EM OUTRAS ESTIRPES DE <i>E. coli</i>	37
TABELA 8 - PERFIS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS ENCONTRADOS EM ESTIRPES DE UPEC	39
TABELA 9 - HEMÓLISE INDUZIDA PELAS ESTIRPES DE UPEC EM ERITRÓCITOS HUMANOS	40
TABELA 10 - PERFIS DE ADESÃO EM CÉLULAS HeLa DE 34 ESTIRPES DE UPEC	43
TABELA 11 - GENES DE VIRULÊNCIA ASSOCIADOS COM DIFERENTES ESTIRPES DE UPEC DE ACORDO COM SEUS FENÓTIPOS DE INTERAÇÃO COM AS CÉLULAS HeLa	44

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR multiplex para genes de virulência em estirpes de UPEC ..	28
FIGURA 2 - Padrão de amplificação para a PCR duplex para os genes PAI e <i>traT</i>	29
FIGURA 3 - Análise de correlação entre genes de virulência.	34
FIGURA 4 - Frequência dos genes entre as estirpes de UPEC e outras <i>E. coli</i>	37
FIGURA 5 - Perfil de susceptibilidade das estirpes de UPEC	38
FIGURA 6 - Hemólise induzida em eritrócitos humanos pelas culturas de <i>E. coli</i> após 3 e 4 horas de crescimento	41
FIGURA 7 - Padrão de adesão agregativo (AA) sobre células da linhagem HeLa	42
FIGURA 8 - Padrão de adesão difuso (DA) sobre células da linhagem HeLa	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aer: gene que codifica para o sideróforo aerobactina

AFA: adesina afimbrial Afa

afa: gene que codifica para a adesina Afa

AMC: amoxicilina + ácido clavulânico

AMP: ampicilina

ATM: aztreonam

BHI: caldo *Brain Hearth Infusion*

CBI: comunidade bacteriana intracelular

CIP: ciprofloxacino

CLSI: *Clinical Laboratory Standards Institute*

CN: gentamicina

CNF: fator necrotizante citotóxico

CRO: ceftriaxona

DAEC: *Escherichia coli* que adere difusamente

DEC: *Escherichia coli* diarreiogênica

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxinucleotídeo trifosfato

EAEC: *Escherichia coli* enteroagregativa

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EIEC: *Escherichia coli* enteroinvasora

EPEC: *Escherichia coli* enteropatogênica

ETEC: *Escherichia coli* enterotoxigênica

ExPEC: *Escherichia coli* patogênica extraintestinal

F1C: fímbria do tipo 1C

FEP: cefepime

FOX: cefoxitina

fur: ferric uptake regulation

GEF: fator de troca de nucleotídeos guanina

hly: gene que codifica para a proteína hemolisina

IL: interleucina

IMP: imipenem

ITU: infecção do trato urinário

iuc: iron uptake chelate

iut: iron uptake transport

v

kb: kilobase

KDa: kilodáton

KF: cefalotina

ml: mililitro

mm: milímetro

NA: ácido nalidíxico

ng: nanograma

nm: nanômetro

PAI: ilha de patogenicidade

pap: pilus associado a pielonefrite

pb: pares de base

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PMN: polimorfonucleares

pmol: picomol

prf : pilus relacionado à fímbria

RPM: rotações por minuto

RNA : ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RNA_t: RNA transportador

SAP: fosfatase alcalina de camarão

Sat: toxina de secreção autotransportadora

Sfa: adesina fimbrial S

sfa: gene que codifica para a adesina fimbrial S

STEC: *Escherichia coli* produtora de toxina shiga

SXT: sulfametoxazol + trimetoprim

TBE: tampão tris/ borato/ EDTA

UFC: Unidade formadora de colônia

UP1a: glicoproteína de membrana integral uroplaquina 1a

UPEC: *Escherichia coli* uropatogênica

VF: fator de virulência

µg: micrograma

µL: microlitro

µL: micrômetro

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Infecção do trato urinário	3
2.1.1 Rotas de entrada dos micro-organismos	4
2.1.2 Classificação das ITUs	5
2.1.3 Diagnóstico Laboratorial das ITUs	7
2.2 <i>Escherichia coli</i>.....	7
2.2.1 Classificação de <i>Escherichia coli</i>	8
2.3 Fatores de virulência de UPEC	9
2.3.1 Adesinas associadas a ITU	10
2.3.1.1 Fímbria tipo 1	11
2.3.1.2 Fímbria P	12
2.3.1.3 Fímbria S	13
2.3.1.4 Adesinas Dr e Afa	13
2.3.2 Sistemas de aquisição de ferro	14
2.3.2.1 Aerobactina	15
2.3.3 Toxinas	16
2.3.3.1 Hemolisina	16
2.3.3.2 Fator necrotizante citotóxico	17
2.3.4 Resistência sérica	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Amostra	21
4.2 Condições de cultivo	21
4.3 Extração do DNA	22

4.4 PCR	22
4.5 Detecção dos produtos de PCR	24
4.6 Sequenciamento de DNA	24
4.7 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	25
4.8 Verificação da produção de hemolisina	25
4.9 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa	26
5 RESULTADOS	28
5.1 PCR-Multiplex	28
5.2 Perfil de virulência das estirpes de UPEC	29
5.3 Perfil de virulência de estirpes de <i>E. coli</i> isoladas de outros sítios anatómicos	34
5.4 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos ..	37
5.5 Produção de hemolisina	39
5.6 Adesão de estirpes de UPEC em células HeLa	41
6 DISCUSSÃO	45
6.1. Virulência em UPEC las HeLa.	45
6.2. Genes de virulência em <i>E. coli</i> isoladas de outras regiões anatómicas	50
6.3. Resistência a antimicrobianos	50
7 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	72

1 INTRODUÇÃO

O trato urinário normalmente é um ambiente estéril, mantido livre de micro-organismos pelo fluxo de urina, pela presença de moléculas antimicrobianas e leucócitos. Entretanto, apesar das formidáveis defesas do hospedeiro e do uso crescente de antibióticos, as infecções do trato urinário (ITU) continuam entre as doenças infecciosas mais comuns em todo o mundo (MUHLDOERFER et al, 2001).

As ITU geralmente são classificadas de acordo com o sítio de infecção: cistite (bexiga) ou pielonefrite (rins). As ITU podem ser assintomáticas ou sintomáticas, estas caracterizadas por um amplo espectro de sintomas variando de disúria a bacteremia e sepse podendo causar a morte (FRENCH, 2006).

ITU sintomática afeta até 30% das mulheres com idade entre 20 e 40 anos, uma prevalência 30 vezes maior do que em homens (WALSH et al, 2002). Geralmente a ITU está associada a micro-organismos da microbiota fecal que expressam fatores adicionais de virulência propiciando sua instalação no trato urinário e posterior infecção.

Os patógenos bacterianos mais comuns incluem gram-negativos tais como: *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp., e gram-positivos como *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus* spp, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo B (ZORC, 2005; FRENCH, 2006).

E. coli é um bacilo gram-negativo anaeróbio facultativo, predominante na microbiota intestinal de humanos e animais. Entretanto, determinadas estirpes são reconhecidamente patogênicas e podem provocar várias doenças nos humanos, como diarreia, meningite, septicemia e infecções do trato urinário (NATARO & KAPER, 2004). *E. coli* é uma das principais causas de doenças infecciosas em humanos e a causa mais comum de infecção do trato urinário (HOOTON & STAMM, 1997; ZHANG & FOXMAN, 2003; STAMM & STAPLETON, 2004).

As ITU ocorrem em pacientes com trato urinário normal anatômica e funcionalmente e primariamente pela rota ascendente após a contaminação da

região periuretral, presumivelmente via reservatório fecal. Envolve a ascensão espontânea da bactéria e colonização da bexiga, resultando em cistite e em casos graves a infecção pode atingir os ureteres e rins causando pielonefrite (OELSCHLAEGGER et al, 2002; CHUNG et al, 2010).

A habilidade de *E. coli* uropatogênica (UPEC) em causar ITU sintomática está associada à expressão de diversos fatores de virulência, incluindo adesinas, como fímbria P e tipo 1, e toxinas tais como hemolisinas (KLEMM et al, 2000; OELSCHLAEGGER et al, 2002).

A severidade da infecção é determinada pela virulência da bactéria infectante e pelos mecanismos de defesa inata do hospedeiro (RAGNARSDÓTTIR et al, 2008).

A emergência da resistência entre os uropatógenos comunitários e hospitalares aos antimicrobianos de primeira escolha limita as opções terapêuticas para as ITU (PIATTI et al, 2008). Como consequência da terapia antimicrobiana pode haver o aumento da prevalência de bactérias resistentes e consequente permuta dos mecanismos de resistência entre bactérias, sendo o uso dos antimicrobianos um importante fator seletivo para a resistência aos antimicrobianos a nível populacional (FOXMAN et al, 2007).

Os beta-lactâmicos, sulfametoxazol-trimetoprim, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos são as drogas antimicrobianas mais comumente prescritas para o tratamento das ITU (ARSLAN et al, 2005). Contudo, o crescente índice de resistência aos antimicrobianos aliado ao fato de que as estirpes de *E. coli* não apresentam um perfil constante de susceptibilidade a estas drogas torna necessária a realização de testes de susceptibilidade (antibiograma) a fim de monitorar os padrões de resistência entre os patógenos causadores de infecções bacterianas frequentes, tais como as infecções urinárias.

O estudo das características de virulência e perfil de resistência aos antimicrobianos de estirpes de UPEC isoladas no nosso meio contribuirá para conhecer as características associadas com a habilidade desses organismos em causar doença, para avaliar a diversidade entre as estirpes, e será útil para auxiliar na seleção de terapia empírica para o tratamento das ITU enquanto se aguarda o resultado do antibiograma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO

A infecção do trato urinário (ITU) é uma resposta inflamatória do uroepitélio à invasão bacteriana que geralmente está associada à bacteriúria e piúria. As ITU são uma das doenças mais comuns em humanos (WALSH et al, 2002).

A urina normal possui propriedades antibacterianas tais como a alta osmolaridade, elevada concentração de uréia e de ácidos orgânicos, e baixo pH. A glicoproteína uromucóide Tamm-Horsfall, produzida pelas células tubulares da alça de Henle ascendente, e secretada na urina em altas concentrações ($> 30\mu\text{g/mL}$), inibe a aderência bacteriana (OELSCHLAEGGER et al, 2002; CADIEUX et al, 2009; CHUNG et al, 2010), por ser capaz de se ligar à fímbria tipo 1, e assim inibir a interação fimbrial com os receptores de uroplaquina (PAK et al, 2001).

O fluxo normal de urina é uma defesa importante do trato urinário uma vez que elimina organismos presentes na urina (SALYERS & WHITT, 2002). A obstrução do fluxo urinário é um fator chave no aumento da susceptibilidade a ITU; a estase resultante compromete os mecanismos de defesa renais e contribui para o aumento da concentração de bactérias na urina facilitando a aderência destas às células uroepiteliais (SCHAEFFER, 2001).

As ITU são mais comuns em mulheres do que em homens, exceto no período neonatal, onde prevalece a susceptibilidade do sexo masculino. ITU sintomática afeta cerca de 30% das mulheres com idade entre 20 e 40 anos, uma prevalência 30 vezes maior do que em homens (WALSH et al, 2002; GUPTA & STAMM, 2008); além da diferença anatômica (a uretra feminina é mais curta), outra razão para isso pode ser a presença de fluidos prostáticos na urina dos homens, conferindo maior atividade antibacteriana (MAHON & MANUSELIS, 1995; CHUNG et al, 2010).

Em adultos do sexo masculino com idade até 65 anos, a incidência de ITU é extremamente baixa, contudo aumenta significativamente em indivíduos com idade acima de 65 anos devido à hiperplasia da próstata e perda da

atividade bactericida da secreção prostática (MAHON & MANUSELIS, 1995; GUPTA & STAMM, 2008).

As infecções urinárias clinicamente importantes geralmente são causadas por bactérias. No entanto, vírus, fungos e parasitas também podem causar ITU. Causas comuns de ITU de origem não bacteriana incluem cistite hemorrágica por adenovírus e infecções por *Candida* em indivíduos imunocomprometidos (ZORC, 2005).

Os patógenos bacterianos comuns incluem gram-negativos tais como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp, *Enterobacter* spp, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia* spp., e gram-positivos como *Enterococcus* spp, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* do grupo B. Destes, *E. coli* é responsável por cerca de 80% das ITU não-complicadas (ZORC, 2005; FRENCH, 2006). A maioria das ITU é causada por um único patógeno, embora infecções mistas possam ocorrer e necessitem de tratamento mais complexo (WAGENLEHNER & NABER, 2004).

2.1.1 ROTAS DE ENTRADA DOS MICRO-ORGANISMOS:

Rota Ascendente:

Infecção ascendente do trato urinário é um processo complexo associado com a adesão e outras propriedades de virulência da bactéria, bem como com a estrutura anatômica, resposta humoral e fatores genéticos do hospedeiro (SVANBORG & GODALY, 1997; FRENCH, 2006).

A maioria das bactérias que entram no trato urinário são constituintes da microbiota fecal que colonizam a uretra e ascendem até a bexiga. Esta rota é reforçada em indivíduos com significativa contaminação do períneo com fezes, mulheres que usam agentes espermicidas e pacientes com cateteres. Da bexiga a bactéria pode atingir os ureteres e ascender para os rins. Esta ascensão é facilitada se a bactéria possuir adesinas específicas ou se algum processo interferir com a função peristáltica normal do ureter (WALSH et al, 2002; CHUNG et al, 2010).

Rota Hematogênica:

A infecção dos rins através da rota hematogênica é incomum em indivíduos normais (GUPTA & STAMM, 2005). Entretanto, os rins podem ser ocasionalmente infectados secundariamente em pacientes com bacteremia (WALSH et al., 2002). A infecção através desta rota é restrita a micro-organismos tais como *S. aureus*, *Candida spp.*, *Salmonella spp.* e *Mycobacterium tuberculosis*, os quais causam infecções primárias em outras regiões anatômicas (NABER et al., 2006).

2.1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS ITU

As ITU podem ser classificadas de acordo com o sítio da infecção como infecção do trato urinário inferior, envolvendo a bexiga e uretra (cistite e uretrite, respectivamente) e infecção do trato superior, acometendo os ureteres e parênquima renal (pielonefrite) (SVANBORG & GODALY, 1997; CONOLLY & THORP, 1999; NAJAR et al, 2009). A colonização da urina na ausência de sintomas clínicos é denominada bacteriúria assintomática (DAROUCHE et al, 2001; TRAUTNER et al, 2003). A presença de febre, calafrios e dor lombar é considerada evidência clínica de infecção do trato urinário superior (DITCHFIELD et al, 2002). O padrão ouro para diagnóstico de ITU é a cultura de urina. Entretanto, o diagnóstico é complicado pela contaminação com a microbiota fecal que coloniza a área perineal e uretra distal. A presença de sintomas de ITU tais como disúria, urgência e aumento da frequência urinária, desconforto suprapúbico e dor lombar auxiliam o diagnóstico (ZORC, 2005).

As infecções do trato urinário podem ser adicionalmente classificadas em quatro categorias:

1- Infecções não-complicadas, que ocorrem em pacientes saudáveis cujo trato urinário apresenta estrutura e função normais. A maioria destes pacientes são mulheres e os patógenos geralmente são susceptíveis a antimicrobianos e erradicados por uma terapia antimicrobiana de baixo custo (WALSH et al, 2002). Estão associadas com alterações mais sutis relacionadas à genética, biologia e fatores comportamentais ou ambientais que promovem o acesso bacteriano ao trato urinário e posterior colonização e/ou infecção

(SCHAEFFER, 2001). *E. coli* é o patógeno predominante, responsável por 80% dos casos (NICOLLE et al, 2002).

2- Infecções complicadas, associadas com anormalidades anatômicas, funcionais ou metabólicas do trato urinário que desabilitam as defesas naturais (SCHAEFFER, 2001; TABIBIAN et al, 2008). Estas anormalidades podem ser intrínsecas, dentre elas a hiperplasia prostática benigna (anormalidade intrínseca obstrutiva), anormalidades congênitas, como bexiga neurogênica e fístulas, ou extrínsecas, associadas ao uso de cateteres ou corpos estranhos. As infecções associadas à obstrução por litíase renal são resolvidas após a correção da anormalidade (remoção do cálculo) (SCHRIER, 2000; NICOLLE, 2001).

Uma característica da ITU complicada é a grande variedade de organismos envolvidos. *E. coli* é o patógeno mais comum, mas outras enterobactérias tais como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus mirabilis* e *Providencia stuartii* ocorrem frequentemente. *P. aeruginosa* e *C. albicans* são comuns em algumas populações. Organismos gram-positivos como enterococos e estafilococos coagulase-negativos também são comumente isolados (NICOLLE, 2001).

Mulheres com ITU complicada associada à cateterização ou anormalidades urológicas geralmente são infectadas por estirpes que não possuem fatores determinantes de virulência (STAMM, 2006).

3- ITU recorrentes, que são reinfecções (bactéria diferente, de fora do trato urinário; cada infecção é um novo evento);

4- ITU recidivante, resultante da persistência bacteriana no trato urinário (WALSH et al, 2002).

ITU recorrentes ou recidivantes ocorrem em aproximadamente 10 a 40% das mulheres, sendo relacionadas com a curta duração do tratamento e também a doses ou antimicrobiano inadequado (NORRBY, 1990).

2.1.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS ITU

Infecção urinária é definida como a presença de organismos na urina, frequentemente em contagens $\geq 10^5$ unidades formadoras de colônia por mL (UFC/mL), uma vez que em condições normais a urina é estéril (SVANBORG & GODALY, 1997; ZORC, 2005).

Desde 1956 a cultura quantitativa de urina tem sido utilizada para o diagnóstico de ITU. Após os estudos realizados por Edward Kass, foi implantado o critério da presença do patógeno em contagem igual ou superior a 10^5 UFC/mL para o diagnóstico de ITU. Todavia, entre os anos 60 e 70 estudos adicionais mostraram que a contagem de colônias na urina de mulheres com infecção sintomática do trato urinário poderia ser inferior a 10^5 UFC/mL. Estas mulheres apresentavam disúria e piúria, e ainda assim teriam o diagnóstico negativo para ITU baseado no critério de Kass (MAHON & MANUSELIS, 1995).

Em 1980 a síndrome uretral aguda foi definida como uma das três causas de disúria e piúria, e cuja contagem de colônias é superior a 10^3 e inferior a 10^5 UFC/mL. Em 1982, Stamm e colaboradores aprimoraram o critério para diagnóstico de ITU com a inclusão da contagem de colônias superior a 10^2 UFC/mL, complementado pela presença de piúria na urina centrifugada. Quando se passou a considerar a presença de piúria, verificou-se que a presença de 10 ou mais leucócitos/mm³ ocorre em mais de 96% das pessoas com bacteriúria significativa e que a maioria das mulheres com piúria, mas sem bacteriúria significativa, apresenta ITU com contagem de colônias inferior a 10^5 UFC/mL ($>10^2$ e $< 10^5$ UFC/mL). Portanto, tornou-se claro que não existe um valor fixo para determinar bacteriúria significativa que possa ser aplicado a todos os tipos de ITU e em todas as circunstâncias (NABER et al, 2006).

2.2 *Escherichia coli*

E. coli pertence ao reino *Bacteria*, filo *Proteobacteria*, classe *Proteobacteria*, subclasse *Gammaproteobacteria*, ordem *Enterobacteriales*, família *Enterobacteriaceae*. É um bacilo gram-negativo, anaeróbio facultativo,

fermenta glicose e outros açúcares, produz gás, é catalase positivo, oxidase negativo e reduz nitrato a nitrito (MURRAY et al, 1999).

E. coli faz parte da microbiota do intestino. Embora a maioria das estirpes de *E. coli* não sejam patogênicas, algumas adquiriram características que as tornam capazes de causar uma variedade de doenças em humanos e animais. As estirpes patogênicas de *E. coli* podem causar três tipos fundamentais de infecções clínicas: doenças entéricas e diarreicas, infecções do trato urinário, sepse e meningite (NATARO & KAPER, 2004).

2.2.1 CLASSIFICAÇÃO DE *E. coli*

E. coli é uma espécie extremamente diversa de bactérias capazes de colonizar e persistir em vários nichos, tanto no ambiente quanto em hospedeiros animais (YAN & POLK, 2004).

Com base nas diferentes propriedades de virulência da bactéria e sintomas clínicos do hospedeiro, as estirpes patogênicas são classificadas em categorias ou patotipos. Existem dois grupos principais que contêm as *E. coli* diarreiogênicas (DEC) e as *E. coli* patogênicas extra-intestinais (ExPEC) (RUSSO & JOHNSON, 2000; KAPER et al, 2004). Os patotipos de *E. coli* diarreiogênica causam gastroenterite, mas raramente alguma doença fora do trato intestinal. Por outro lado, as estirpes de ExPEC mantêm a capacidade de colonizar o intestino sem causar doença, porém são capazes de se disseminar e colonizar outros nichos no hospedeiro, incluindo a corrente sanguínea, sistema nervoso central e trato urinário, resultando em doenças (WILES et al, 2008).

As estirpes *E. coli* diarreiogênicas incluem: *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), associada à diarreia dos viajantes; *E. coli* produtora de toxina Shiga (STEC), associada com diarreia, colite hemorrágica e síndrome urêmico-hemolítica; *E. coli* enteroinvasora (EIEC), associada com infecções intestinais que envolvem a invasão dos enterócitos, diarreia aquosa e disenteria; *E. coli* enteroagregativa (EAEC), associada à diarreia persistente em humanos; *E. coli* que adere difusamente (DAEC) e *E. coli* enteropatogênica (EPEC), que causa diarreia em crianças (NATARO & KAPER, 2004).

As infecções extra-intestinais são causadas por três patotipos de *E. coli*: estirpes uropatogênicas (UPEC), causadoras de infecções do trato urinário, estirpes envolvidas em meningite neonatal e estirpes que causam septicemia (NATARO & KAPER, 2004; JOHNSON et al, 2008).

Embora a virulência seja uma característica multifatorial, essas estirpes podem ser distinguidas pela presença de marcadores de virulência específicos. Alguns genes de virulência estão localizados em elementos móveis como plasmídeos, fagos, transposons, ou em ilhas de patogenicidade (MUHLDOERFER & HACKER, 1994; BEKAL et al, 2003).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA DE *E. coli* uropatogênica (UPEC)

Virulência é definida como a habilidade de um organismo causar doença em um determinado hospedeiro. Em *E. coli*, a virulência é resultado do efeito cumulativo de uma ou diversas propriedades especiais, ou fatores de virulência, os quais permitem distinguir patógenos potenciais de estirpes intestinais inofensivas (JOHNSON, 1991).

Os fatores de virulência incluem mecanismos que contribuem para a instalação do patógeno no tecido hospedeiro, subvertendo as barreiras de defesa do sistema imune; os genes responsáveis pela codificação destes fatores podem estar em cromossomos, fagos ou plasmídeos (MUHLDOERFER & HACKER, 1994; JOHNSON & STELL, 2000; DONNENBERG & WHITTAM, 2001).

No cromossomo, os atributos associados com virulência geralmente são codificados em ilhas de patogenicidade (PAIs). Sua aquisição provém da transferência horizontal de genes entre linhagens e mesmo entre espécies (BOYD & HARTL, 1998; DONNENBERG & WHITTAM, 2001; BEKAL et al, 2003; LLOYD et al, 2009). As ilhas de patogenicidade consistem em extensos segmentos de DNA cromossomal variando de 5 a 200 kb, contendo um conjunto de genes associados com virulência que estão inseridos dentro ou próximo aos genes de RNAt; PAIs são instáveis e apresentam um conteúdo de C+G que difere do resto do genoma (BLUM et al, 1994; HACKER et al, 1997; SCHMIDT & HENSEL, 2004).

Os fatores de virulência de UPEC incluem adesinas, sideróforos, toxinas, antígenos polissacarídicos e capsulares, os quais tornam a bactéria capaz de se ligar e lesar as células e os tecidos do hospedeiro fora do trato intestinal, evitando ou subvertendo os mecanismos de defesa nestes sítios, estimulando uma resposta inflamatória no hospedeiro e causando a doença extra-intestinal (GUYER et al, 2000; WALSH et al, 2002; JOHNSON, 2003).

Estirpes associadas à pielonefrite pertencem a um número limitado de sorotipos e possuem vários genes que codificam características associadas com virulência como fímbrias, sideróforos e toxinas (hemolisina). Estes genes de virulência ocorrem geralmente em ilhas de patogenicidade. As estirpes de *E. coli* isoladas de pacientes com ITU complicada mostram menor prevalência de genes de virulência comparadas às estirpes de *E. coli* isoladas de ITU não-complicada (NICOLLE, 2001).

A presença de PAIs é uma característica presente em estirpes de UPEC associadas com formas clinicamente severas da infecção (KAO et al, 1997; GAL-MOR & FINLAY, 2006).

2.3.1 ADESINAS ASSOCIADAS A ITU

O trato urinário humano está submetido constantemente a forças hidrodinâmicas, e a aderência ao epitélio do trato urinário confere à bactéria resistência ao mecanismo de remoção pelo fluxo urinário. A aderência bacteriana contribui para a virulência pela promoção da colonização do trato urinário, assim como invasão, formação de biofilme e danos às células do hospedeiro (SIITONEN, 1994; WU et al, 1996; CONNELL et al, 1996; ETO et al, 2007).

A adesão é considerada um passo essencial para a bactéria se estabelecer no hospedeiro e causar uma infecção; deste modo, as adesinas são essenciais para a patogênese e geralmente estão localizadas na extremidade das fímbrias, apêndices filamentosos presentes na superfície bacteriana (BAHRANI-MOUGEOT et al, 2001; WELCH et al, 2002).

Estirpes de UPEC podem expressar várias classes de adesinas que medeiam a adesão através da ligação específica a diferentes receptores.

Adesinas específicas incluindo fímbria P, fímbria tipo 1 e outras como F1C, S, e Dr auxiliam na colonização e desempenham um importante papel no desenvolvimento de ITU em humanos (JOHNSON, 1991; OELSCHLAEGGER et al, 2002; STAMM, 2006).

Os dois tipos de fímbria mais comumente encontrados em isolados de UPEC são a fímbria tipo 1 (manose-sensível) e fímbria P (manose-resistente), morfologicamente similares mas diferem entre si pela habilidade em mediar a hemaglutinação na presença de manose (SVANBORG & GODALY, 1997).

2.3.1.1 Fímbria tipo 1

As fímbrias tipo 1 são importantes determinantes de virulência expressos pela maioria das estirpes de *E. coli* (FRENCH, 2006), bem como pela maioria dos membros da família *Enterobacteriaceae*, e medeiam a ligação aos oligossacarídeos de manose (KROGFELT et al, 1990; MARTINEZ et al, 2000; SAUER et al, 2002).

As bactérias que expressam a fímbria tipo 1 aglutinam eritrócitos de diferentes espécies de animais e a aderência mediada por esta fímbria é bloqueada por D-manose ou α -metilmanosídio e por concanavalina A, mas não pela adição de outros monossacarídeos ou derivados. A temperatura não interfere na capacidade hemaglutinante da fímbria tipo 1, ao contrário das fímbrias manose-resistentes, que têm a atividade hemaglutinante melhor demonstrada a 4°C (JOHNSON, 1991).

Estas fímbrias consistem de filamentos helicoidais de 1-2µm de comprimento e 7nm de diâmetro, compostos de repetidas subunidades da proteína estrutural FimA aderidas a estruturas de 3nm de largura contendo a adesina FimH (JONES et al, 1995). A ligação da adesina FimH a receptores manosilados presentes no urotélio é essencial para a colonização da bexiga por estirpes de *E. coli* e o desenvolvimento da cistite (LANGERMANN et al, 1997; THANKAVEL et al, 1997; WRIGHT et al, 2007).

Fim H se liga ao receptor da uroplaquina 1a (UP1a) presente nas células da superfície da bexiga promovendo a aderência bacteriana e consequente rearranjo do citoesqueleto de actina das células do hospedeiro, o que estimula o englobamento das bactérias aderentes. Após a internalização ocorre um

processo complexo que envolve alterações morfológicas e fisiológicas nas células bacterianas culminando na formação de biofilme (WU et al, 1996; MARTINEZ et al, 2000; WRIGHT et al, 2007).

Após a formação de biofilmes, são formadas comunidades bacterianas intracelulares (CBIs), as quais atuam como reservatórios quiescentes do patógeno, protegidos contra os mecanismos de defesa inata do hospedeiro e tratamento com antimicrobianos, além de servir como fonte para ITU subsequentes (JUSTICE et al, 2006).

2.3.1.2 Fímbria P

A fímbria P, encontrada na superfície de algumas estirpes patogênicas de *E. coli*, interage com um receptor específico nas células epiteliais, os quais contêm uma molécula do carboidrato α -D-galactopiranosil-(1→4)- β -D-galactopiranosídeo, encontrado no antígeno do grupo sanguíneo P. A correlação entre a presença da fímbria P e a severidade da infecção é justificada pela baixa prevalência (10 a 20%) desta adesina em estirpes de *E. coli* da microbiota fecal em indivíduos assintomáticos, pela alta prevalência (50 a 60%) em estirpes causadoras de cistite e prevalência ainda maior (70 a 100%) em estirpes causadoras de pielonefrite (SVENSON et al, 1983; STAPLETON et al, 1995).

Esta fímbria é codificada pelo operon *pap* (*pili* associado à pielonefrite), que pode estar presente em um ou mais elementos genéticos móveis (ilhas de patogenicidade) (RASKO et al, 2001). Contém uma subunidade maior, PapA, que constitui a estrutura da fímbria, e três subunidades menores, PapE, PapF e PapG, localizadas na extremidade da fímbria (JOHNSON, 1991; OELSCHLAEGGER, 2002). A ligação de PapE e PapF aos receptores Gal α (1-4)Gal nas células uroepiteliais impede a eliminação da bactéria da bexiga, rompe a barreira mucosa e incita a resposta imune do hospedeiro (BERGSTEIN et al, 2004).

A fímbria P aumenta a virulência de UPEC em diferentes estágios durante a patogênese da infecção do trato urinário. Estirpes *pap*⁺ permanecem mais tempo na microbiota intestinal e se alastram de forma mais eficiente para o trato urinário do que as estirpes *pap*⁻. Uma vez no trato urinário, as estirpes com a fímbria P estabelecem bacteriúria e podem atravessar a barreira epitelial para a corrente sanguínea (WARREN et al, 1988). As estirpes com fímbria P estabelecem bacteriúria mais rapidamente e aumentam a resposta do hospedeiro à infecção, com recrutamento de neutrófilos e elevação dos níveis de IL-6 e IL-8 na urina, o que sugere que a fímbria P preenche o postulado molecular de Koch-Henle como um fator de virulência no trato urinário humano (WULLT et al, 2001).

2.3.1.3 Fímbria S

Membros da família de adesinas fimbriais S são comumente expressos em estirpes de UPEC isoladas de humanos. Esta família de adesinas consiste da fímbria S (Sfa), com os subtipos Sfa-I e Sfa-II; fímbria F1C (Foc) e fímbria relacionada a S/F1C (Sfr) (HACKER et al, 1993; STAMM, 2006).

As fimbrias S reconhecem um receptor contendo α -sialyl-2-3- β -lactose e são expressas principalmente por estirpes causadoras de sepse e meningite, mas também são encontradas em isolados de infecção do trato urinário (KORHONEN et al, 1985), ao passo que a fímbria F1C se liga a estruturas contendo β -GalNac-1,4- β -Gal e são preferencialmente expressas por isolados de ITU (KHAN et al, 2000).

2.3.1.4 Adesinas Dr e Afa

As adesinas da família Dr constituem outro fator de virulência associado com ITU cuja expressão tem sido relacionada ao aumento do risco de um segundo episódio da infecção (FOXMAN, 1995). A importância destas adesinas nas ITU crônicas e recorrentes tem sido demonstrada pela habilidade

apresentada pelas estirpes de *E. coli* Dr⁺ para invadir e se multiplicar no interior das células epiteliais *in vitro* (GUIGNOT et al, 2001).

A família Dr inclui adesinas fimbriais, como a hemaglutinina Dr (adesina DraE) e F1845, e adesinas afimbriais, diretamente associadas à superfície da célula bacteriana, tais como AFA-I, AFA-II, AFA-III e AFA-IV (NOWICKI et al, 2001; VAN LOY et al, 2002a,b; PETTIGREW et al, 2004), as quais estimulam a ligação de bactérias em diversos tipos de células hospedeiras (SERVIN, 2005; COTA et al, 2006). Estas adesinas são frequentemente codificadas por estirpes de *E. coli* que aderem difusamente (DAEC), e são epidemiologicamente associadas com estirpes patogênicas causadoras de ITU crônicas e recorrentes, cistite em crianças e pielonefrite em gestantes (NOWICKI et al, 2001).

Além da aderência bacteriana, diversos fatores de virulência podem contribuir para a patogenicidade de UPEC, incluindo a produção de α -hemolisina e aerobactina (DONNENBERG & WECH, 1996; EMODY et al, 2003).

2.3.2 SISTEMAS DE AQUISIÇÃO DE FERRO

Enquanto as organelas adesivas promovem a aderência bacteriana às células e tecidos hospedeiros, os sideróforos como a aerobactina e enterobactina permitem melhor captação de ferro pelas estirpes de UPEC (DHAKAL et al, 2008).

No hospedeiro mamífero, a concentração de formas solúveis de ferro é muito baixa, sendo de aproximadamente 10^{-25} M no sangue e muitas vezes inferiores em outros sítios, inclusive no trato urinário, sendo um fator limitante do crescimento bacteriano (BARASCH & MORI, 2004; SNYDER et al, 2004; FISCHBACH et al, 2006; ROOS et al, 2006), uma vez que a bactéria requer uma concentração de ferro citoplasmática de aproximadamente 10^{-6} M para o seu desenvolvimento (ANDREWS, 2003). A aquisição de ferro tem um papel importante na sobrevivência bacteriana e na patogenicidade. As bactérias patogênicas, inclusive as ExPEC (e principalmente UPEC) desenvolveram estratégias para aquisição e armazenamento de ferro do hospedeiro, como a expressão de sideróforos, estruturas de baixo peso molecular que quelam o

ferro com alta afinidade (RUSSO et al, 1999; DURANT et al, 2007; WILES et al, 2008).

Os sideróforos são secretados para o meio e após a formação do complexo ferro-sideróforo são retomados por receptores presentes na superfície bacteriana. Algumas bactérias não só produzem os próprios sideróforos, mas também receptores capazes de se ligar a sideróforos produzidos por outros organismos (SALYERS & WHITT, 2002).

2.3.2.1 Aerobactina

As estirpes de *E. coli*, em sua maioria, possuem o sistema de aerobactina codificado por um operon de 5 genes, dos quais quatro codificam enzimas necessárias para a síntese da aerobactina e um quinto gene codifica a proteína do receptor de membrana externa (JOHNSON, 1991). Os passos na biossíntese da aerobactina são catalisados pelos produtos dos genes *aer* e envolvem a hidroxilação da lisina, acetilação do grupo hidroxila a ácido hidroxâmico e condensação de duas moléculas de ácido hidroxâmico com citrato (BAGG & NEILANDS, 1987; DE LORENZO et al, 1986).

Os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da aerobactina e o gene da proteína receptora da aerobactina-férrica podem estar situados em plasmídios ou em cromossomos, sendo que em isolados humanos predomina a localização cromossomal, e o sistema aerobactina é regulado pela concentração intracelular de ferro, através do gene cromossomal *fur* (JOHNSON, 1991).

A aerobactina é produzida por estirpes de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção do trato urinário, bacteremia e outras infecções extraintestinais, visto que as bactérias portadoras do sistema aerobactina têm a vantagem de crescer em condições de baixas concentrações de ferro, como por exemplo, no soro e na urina (JOHNSON, 1991).

2.3.3 TOXINAS

Apesar de a função específica das toxinas α -hemolisina e CNF1 na patogênese de ITU mediada por UPEC ser pouco compreendida, sabe-se que estas duas toxinas são coexpressas por muitas estirpes que são capazes de causar citotoxicidade direta aos tecidos do hospedeiro (DAVIS et al, 2006; YAMAMOTO, 2007).

As toxinas secretadas por UPEC incluem α -hemolisina, fator necrotizante citotóxico do tipo 1 (CNF-1) e toxina de secreção autotransportadora (Sat), as quais são capazes de alterar as cascatas de sinalização da célula hospedeira, modular a resposta inflamatória e estimular a destruição da célula hospedeira, liberando os nutrientes necessários e permitindo que UPEC tenha acesso ao trato urinário (DHAKAL et al, 2008).

2.3.3.1 Hemolisina

A α -hemolisina consiste de uma proteína extracelular termo-lábil, cálcio-dependente, capaz de lisar eritrócitos através da formação de poros na membrana, promovendo, assim, o extravasamento do conteúdo citoplasmático da célula, podendo levar à morte celular; apresenta ainda espectro de atividade sobre outros tipos de células. A expressão de hemolisina está associada a estirpes patogênicas de *E. coli*, principalmente aquelas causadoras das formas clinicamente mais severas de ITU. A atividade pró-virulência da hemolisina é multifatorial, incluindo desprendimento de ferro dos eritrócitos, destruição dos fagócitos e toxicidade direta ao tecido hospedeiro (JOHNSON, 1991; OSTOLAZA & GONI, 1995; RASKO, 2001; MARRS et al, 2005).

Segundo Johnson (1991), em isolados de humanos a localização de *hly* é cromossomal, em contraste à localização plasmidial deste operon em isolados de animais.

Smith e colaboradores (2008) demonstraram a importância que Hly e CNF1 desempenham na patogênese de ITU provocadas por UPEC. Hly é capaz de provocar danos ao uroepitélio e induzir hemorragia na bexiga durante

os estágios iniciais de cistite mediada por *E. coli* em ratos, enquanto CNF1 estimula a inflamação aguda na bexiga, revelando uma função crítica desta toxina na indução do edema na submucosa.

Segundo Mansson e colaboradores (2007), quando em altas concentrações a hemolisina exerce efeito citolítico, enquanto em baixas concentrações induz a sinalização intracelular de cálcio, levando a respostas pró-inflamatórias, como a produção de IL-6 e IL-8.

2.3.3.2 Fator necrotizante citotóxico

Outra toxina produzida por algumas estirpes de UPEC é o fator necrotizante citotóxico do tipo 1 (CNF-1), o qual induz apoptose em células da bexiga, aumento da adesão celular e produção de superóxido, mas sua função na patogênese da ITU ainda é controverso (OELSCHLAEGER et al, 2002).

CNF1 é uma toxina codificada no cromossomo de estirpes de UPEC, que catalisa a deamidação de GTPases da família Rho (RhoA, Rac e Cdc42), proteínas regulatórias que funcionam como comutadores moleculares, alternando entre o estado ativo de ligação ao GTP e o estado inativo (OLSON et al, 1995; SCHIMIDT et al, 1998; LERM et al, 1999; REN et al, 1999; DAVIS et al, 2006; FALZANO et al, 2006; GIAMBOI-MIRAGLIA et al, 2007; LEMONNIER et al, 2007).

A deamidação por CNF1 previne a hidrólise do GTP a GDP, o que torna estas GTPases constitutivamente ativas, induzindo um rearranjo do citoesqueleto de actina e formação de extensões da membrana na célula hospedeira, anormalidades do ciclo celular, como por exemplo, bloqueio da citocinese e consequente formação de células gigantes multinucleadas (MILLS et al, 2000; RIPPERE- LAMPE et al, 2001; DAVIS et al, 2005; OSWALD et al, 2005; VILLALONGA & RIDLEY, 2006).

Além disso, CNF1 promove apoptose das células epiteliais da bexiga, possivelmente estimulando sua esfoliação e aumentando o acesso bacteriano ao tecido subjacente (MILLS et al, 2000).

CNF1 é codificado em uma ilha de patogenicidade (SWENSON et al, 1996; BLUM et al, 1995), e geralmente é co-expresso com a α -hemolisina em estirpes de UPEC (RIPPERE-LAMPE et al, 2001a, b).

Em várias estirpes de UPEC *hly* e *cnf1* estão associados a *pap/prs*, juntamente com os genes da fímbria S (*sfa*) (LANDRAUD et al, 2000).

CNF1 modula a função de leucócitos polimorfonucleares (PMN), diminuindo a sua capacidade fagocítica e atividade bactericida (DAVIS et al, 2005). A produção de CNF1 também aumenta a capacidade de estirpes de UPEC em resistir à destruição pela fagocitose, o que por sua vez, permite que a bactéria tenha acesso aos tecidos mais profundos e persistam no trato urinário inferior (RIPPERE-LAMPE et al, 2001a, b).

2.3.4 Resistência sérica

As estirpes de UPEC também podem apresentar resistência ao soro, a habilidade de evitar a atividade bactericida do soro, uma característica importante para a patogênese uma vez que auxilia a bactéria a persistir nos fluidos e órgãos internos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003).

As bactérias são destruídas no soro humano normal, através da atividade lítica do sistema complemento (JOHNSON, 1991). A maior atividade bactericida do soro vem da ação lítica do sistema complemento na superfície bacteriana. O complemento pode ser ativado via formação de um complexo antígeno-anticorpo específico (via clássica) ou diretamente pela estrutura polissacarídica do envelope celular, na ausência de anticorpos específicos (via alternativa). O mecanismo de resistência ao soro envolve alterações na superfície celular as quais impedem o reconhecimento pelos anticorpos do hospedeiro através da cápsula, lipopolissacarídeos ou proteínas codificadas por plasmídeos, e desta forma, inibem a ativação/ funcionamento da reação em cascata do sistema complemento (LEYING et al, 1990; JOHNSON, 1991).

Segundo Johnson (1991), estirpes resistentes ao soro são geralmente mais nefropatogênicas em comparação às estirpes sensíveis, e os isolados de pacientes com pielonefrite e cistite são mais resistentes ao soro do que isolados de pacientes com bacteriúria assintomática ou amostras fecais.

A proteína TraT, uma lipoproteína de membrana externa codificada pelo gene *traT*, parece contribuir para a resistência ao soro. O gene *traT* aumenta a resistência ao soro em estirpes não encapsuladas, quando presente em baixo número de cópias, enquanto em estirpes encapsuladas, números mais altos de cópias do *traT* devem estar presentes para afetar a resistência ao soro (MELLATA et al, 2003).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar os fatores de virulência e o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de estirpes de *E. coli* isoladas de culturas de urina com contagem $\geq 10^5$ UFC/mL.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a presença dos genes que codificam para as adesinas fímbria P (*pap*), fímbria S (*sfa*) e adesina afimbrial I (*afaI*);
- Determinar a presença dos genes que codificam para o sideróforo aerobactina (*aer*);
- Determinar a presença dos genes que codificam para as toxinas alfa-hemolisina (*hly*) e fator necrotizante citotóxico tipo 1 (*cnf1*);
- Verificar a presença de marcadores para a ilha de virulência identificada na estirpe nefritogênica CFT072 (PAI);
- Verificar a presença do gene *traT*;
- Determinar se estes genes estão presentes em estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos;
- Verificar a presença de CVD432, um marcador de *E. coli* enteroagregativa (EAEC), entre as *E. coli* isoladas de urina.
- Determinar o perfil de susceptibilidade das estirpes de *E. coli*
- Comparar as informações sobre virulência e resistência aos antimicrobianos entre estirpes de *E. coli* isoladas de amostras de urina com discreta a moderada resposta leucocitária com aquelas isoladas de urina com intensa resposta leucocitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é parte do projeto Caracterização molecular e fatores de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de urina (UPEC), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – UFPR sob o número de registro CEP/ SD: 844.179.09.11, CAAE: 0091.0.091.000-09.

4.1 Amostra

Foram analisadas 204 estirpes de *E. coli* previamente isoladas de culturas de urina (UPEC) com contagem igual ou superior a 10^5 UFC/mL e identificadas através de testes bioquímicos convencionais. Essas bactérias foram classificadas em 2 grupos de acordo com o número de leucócitos presentes na amostra de urina da qual foram isoladas. O grupo 1 foi constituído por 104 UPEC isoladas de urinas com número de leucócitos < 8 por campo em aumento de 400x; o grupo 2 foi constituído por 100 UPEC isoladas de urinas com número de leucócitos ≥ 8 por campo em aumento de 400x.

As bactérias foram isoladas de pacientes que realizaram culturas em um laboratório de análises clínicas de Curitiba em 2010. Paralelamente foram analisadas outras 77 *E. coli*, das quais 38 são estirpes diarreio gênicas (EPEC, EAEC e DAEC) parte da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da UFPR; outras 39 estirpes de *E. coli* foram isoladas de culturas realizadas em um laboratório de Curitiba e contém 27 isolados da microbiota intestinal, 4 de hemoculturas, 3 de secreções de feridas, 2 de material cirúrgico (apendicite, peritonite), 2 de abscesso e 1 de esperma. As bactérias foram estocadas a -20°C em TSB/glicerol 20%.

4.2 Condições de cultivo

As bactérias foram crescidas em ágar MacConkey e incubadas em estufa estacionária a 36°C durante 18-24 horas.

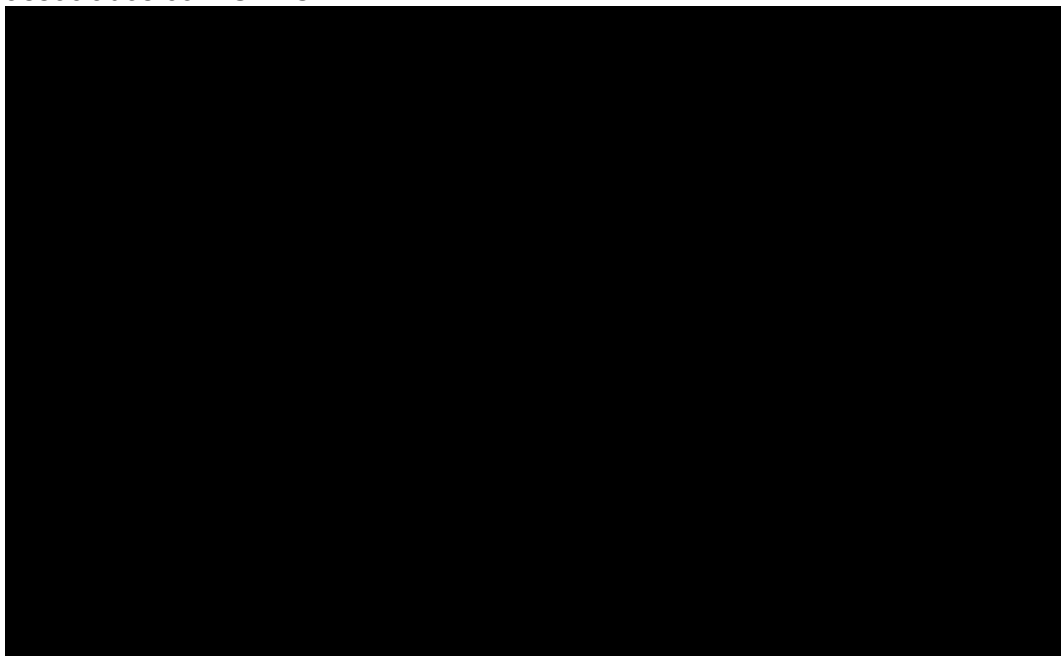
4.3 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método da fervura (SAMBROOK et al, 1989). As colônias foram ressuspensas em 100µL de água deionizada estéril e as suspensões bacterianas foram fervidas por 10 minutos para liberação do DNA. Após o resfriamento, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm (microcentrífuga Eppendorf modelo 5410) por 2 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo novo e mantido a -20°C até o momento da análise.

4.4 PCR

A presença dos genes de virulência associados com UPEC *pap*, *sfa*, *afa*, *hly*, *aer* e *cnf1*, foi determinada por PCR multiplex utilizando os oligonucleotídeos iniciadores descritos em Yamamoto e colaboradores (1995). Outro sistema de PCR multiplex foi empregado para a detecção dos genes que codificam PAI e *traT*; foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Johnson e Stell (2000). Os oligonucleotídeos iniciadores foram sintetizados pela Sinapse Biotecnologia, SP, e as respectivas sequências de nucleotídeos estão indicadas na tabela 1.

TABELA 1 - Iniciadores utilizados para a amplificação dos genes de virulência associados com UPEC



As reações foram realizadas em volume final de 25 μ L, contendo tampão da Taq 1X (Sinapse), $MgCl_2$ (1,5mM), dNTP (0,2mM), Taq 5U (Sinapse) e 5 μ L do extrato contendo DNA. A concentração dos iniciadores nas reações foi de 10pmol cada.

Foi utilizado o termociclador Veriti™ 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems), e um mesmo programa foi utilizado para ambas as reações de PCR. Os parâmetros utilizados estão indicados na Tabela 2.

TABELA 2 – Programa utilizado para PCR-Multiplex

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	} 30
Anelamento	63°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min 30 seg	
Extensão	72°C	5 min	1

Todas as 204 *E. coli* isoladas de urina (UPEC) foram também analisadas por PCR quanto a presença de CVD432, uma sequência associada com o plasmídeo pAA, e utilizada como um marcador para EAEC. Para isso foram empregados os oligonucleotídeos iniciadores descritos por Aranda e colaboradores (2004), EAEC1 - 5' CTGGCGAAAGACTGTATCAT -3' e EAEC2 5' CAATGTATAGAAATCCGCTGTT-3'.

As condições da reação de PCR foram as mesmas descritas acima exceto pelo programa utilizado, que está descrito abaixo.

TABELA 3 – Programa utilizado para PCR para CVD432

Etapa	Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
Desnaturação	94°C	4 min	1
Desnaturação	94°C	1 min	} 30
Anelamento	58°C	30 seg	
Extensão	72°C	1 min	
Extensão	72°C	5 min	1

4.5 Detecção dos produtos de PCR

A detecção dos produtos de PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 2% preparado em tampão TBE 1X concentrado (TRIS 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM). A corrida eletroforética foi realizada em tampão TBE 1X durante 3 horas a 35 V. Os géis foram corados em solução de brometo de etídeo 0,5 µg/mL (SAMBROOK et al, 1989) por 15 minutos e o produto visualizado em transiluminador com luz ultravioleta e as imagens registradas utilizando o Sistema UVP Imaging System.

4.6 Sequenciamento de DNA

Os produtos de PCR foram purificados através do tratamento com as enzimas Exonuclease I (USB 3,3U) e SAP (Fosfatase alcalina de camarão USB

0,66U) para a eliminação de resíduos de iniciadores e dNTP. O produto da reação foi utilizado para a reação de sequenciamento pelo método de terminação de cadeia segundo SANGER et al (1977) modificado, e ddNTP marcados com fluoróforos (kit DYEnamic ET Dye Terminator, Amersham Biosciences). O volume final das reações foi de 10µL, contendo 10pmol do oligonucleotídeo iniciador, aproximadamente 200ng do produto de PCR purificado e 4µL de DYEnamic ET Sequence Premix Terminator. O programa utilizado consiste de 30 ciclos a 94°C por 30 seg, 56°C por 30 seg, 60°C por 30 seg. Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 2µL de acetato de amônio 7,5M e 60 µL de etanol absoluto. A mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 20 minutos. Após, foi centrifugada a 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi removido e o precipitado foi lavado duas vezes com 250 µL de etanol 70% e seco em estufa a 37°C. O DNA foi dissolvido em 4 µL de *Formamide Loading Dye* e aplicado no sequenciador automático. As sequências obtidas foram analisadas com os programas BioEdit Sequence Alignment Editor (HALL, 1999), BLASTn (ALTSCHUL et al, 1997) e ClustalW (THOMPSON, HIGGINS & GIBSON, 1994).

4.7 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado através da técnica de disco-difusão (Kirby-Bauer) utilizando os seguintes antimicrobianos: ácido nalidíxico, ciprofloxacino, gentamicina, amoxicilina-ácido clavulânico, sulfametoxazol-trimetoprim, cefepime, cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, ampicilina, aztreonam e imipenem, conforme preconizado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

A estirpe padrão *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada para o controle de qualidade do ensaio.

4.8 Verificação da produção de hemolisina

A habilidade de diferentes estirpes de *E. coli* em provocar a lise de eritrócitos (hemólise) foi determinada através do método de Scheffer e colaboradores (1988) com algumas modificações. Resumidamente, estirpes de *E. coli* foram inoculadas em caldo BHI (caldo infusão de cérebro e coração) e incubadas sob agitação constante em *shaker* (150 rpm) a 37°C. Snyder e Koch (1966) relataram que meios de cultura contendo infusão de coração estimulam a produção de hemolisinas. Após 2 horas de incubação porções da cultura foram coletadas de hora em hora até completar 6 horas. Porções da cultura (0,2 mL) foram incubadas por duas horas a 37°C com 0,2 mL de uma suspensão contendo eritrócitos humanos do grupo “O” Rh positivo (10^8 /mL), 20 mM CaCl_2 , 10 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,4 e depois centrifugadas a 2000 rpm por 3 minutos. A absorbância da hemoglobina livre no sobrenadante foi determinada em 550 nm. Os níveis de hemólise foram representados em porcentagem em relação ao controle positivo (hemólise de 100% obtida através de uma suspensão de eritrócitos sem tratamento bacteriano, 0,2 mL de BHI e Triton X-100 0,1%).

4.9 Ensaio de adesão celular utilizando células HeLa

O padrão de aderência das estirpes de *E. coli* foi determinado utilizando-se monocamadas da linhagem celular HeLa (célula epitelial de carcinoma de cérvix – ATCC) baseado em metodologias descritas por SCALETSKY et al (1984, 1999).

As células HeLa foram cultivadas em frascos de cultura com faces planas contendo meio de cultivo celular DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e mantidas sob atmosfera de 5% de CO_2 e temperatura de 37°C. Após remoção do tapete celular com tripsina e contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas em número de 2×10^4 por poço em microplacas de 24 poços contendo lamínulas de vidro estéreis. As microplacas foram incubadas a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 por 24 horas.

Para a realização dos ensaios de adesão, as células HeLa foram lavadas duas vezes com PBS (solução salina tamponada) estéril e uma vez com DMEM. A cada poço contendo o cultivo celular foi adicionado 400 uL de DMEN, 100 uL de cada cultura bacteriana padronizada na escala 0,5 de MacFarland e manose 2%. Após 3 horas de incubação a 37°C, as culturas foram lavadas 4 vezes com PBS estéril, fixadas com 2% de formol por 2 minutos e submetidas a coloração de MayGrünwald-Giemsa. Após a coloração, as lamínulas foram lavadas em água corrente, secas e analisadas em microscópio óptico Zeiss Axiophot com sistema de captura de imagem acoplado.

Como controles foram utilizadas estirpes de *E. coli* da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia da UFPR que apresentavam os perfis de aderência localizada, agregativa e difusa.

5. RESULTADOS

5.1 PCR - Multiplex

Para a detecção dos genes *aer*, *afa*, *cnf1*, *hly*, *pap* e *sfa* foi realizada PCR multiplex contendo os seis conjuntos de iniciadores descritos por Yamamoto e colaboradores. (1995). Para os genes PAI e *traT* foi estabelecido um sistema de PCR duplex de acordo com Johnson & Stell (2000). A utilização de sistemas de PCR multiplex permite a amplificação de vários genes simultaneamente reduzindo tempo de ensaio e custos. Os resultados representativos obtidos para algumas estirpes de UPEC estão indicados nas figuras 1 e 2.

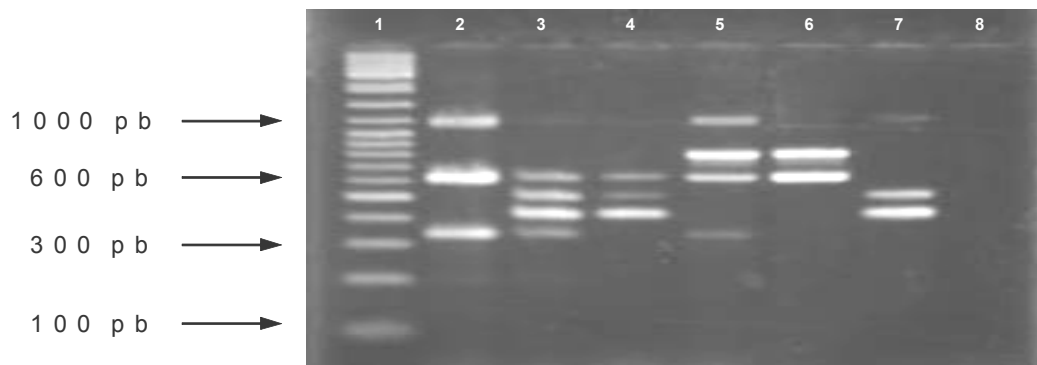


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 2% mostrando os produtos de PCR multiplex para genes de virulência em estirpes de UPEC. Linha 1: Marcador de massa molecular DNA Ladder (Fermentas). Linha 2: produtos de amplificação dos genes *pap*, *aer*, *hly*. Linha 3: produtos de amplificação dos genes *pap*, *sfa*, *cnf1*, *aer*. Linha 4: produtos de amplificação dos genes *sfa*, *cnf1*, *aer*. Linha 5: produtos de amplificação dos genes *pap*, *aer*, *afa*, *hly*. Linha 6: produtos de amplificação dos genes *aer*, *afa*. Linha 7: produtos de amplificação dos genes *sfa*, *cnf1*, *hly*. Linha 8: Branco da reação.

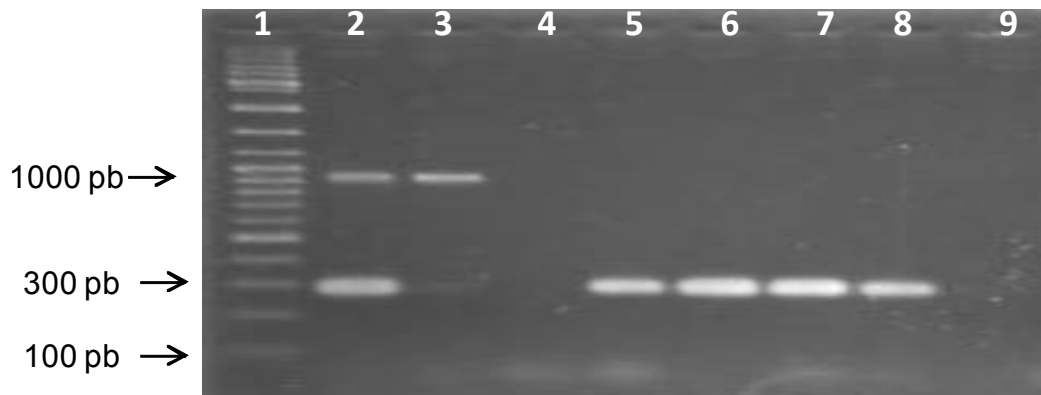


Figura 2. Padrão de amplificação para a PCR duplex para os genes PAI e *traT*. Eletroforese em gel de agarose a 2%. Linha 1: marcador DNA Ladder (Fermentas). Linhas 2 e 3: Produtos de amplificação dos genes PAI e *traT*. Linha 4: UPEC com resultado negativo para os genes *traT* e PAI. Linhas: 5, 6, 7 e 8: Produtos de amplificação do gene *traT*. Linha 9: Branco da reação.

Os produtos de PCR apresentaram os tamanhos esperados, conforme descrito por Yamamoto e colaboradores (1995) e Johnson e Stell (2000). Os fragmentos amplificados na reação de PCR realizada com o de DNA da estirpe UPEC 2 indicando a presença dos genes de virulência (*traT*, PAI, *pap*, *aer* e *hly*) foram sequenciados para confirmar a sua identidade; o mesmo foi feito para a UPEC 3 (PAI, *pap*, *sfa*, *cnf1* e *aer*). Os resultados estão indicados no anexo 1.

5.2 Perfil de virulência das estirpes de UPEC

Um total de 204 estirpes de *E. coli* uropatogênicas e 77 estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos foram analisadas quanto a presença dos genes associados com virulência acima citados.

Nenhuma das 204 estirpes de UPEC apresentou a sequência CVD432, indicando que não há marcadores característicos de EAEC entre essas estirpes.

Entre as 204 estirpes de UPEC, 184 (90,2%) apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência estudados. Os resultados obtidos estão indicados na Tabela 4.

TABELA 4: Distribuição de genes de virulência em estirpes de UPEC.

Estirpe	Genes de virulência								leucócitos
	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf</i>	<i>hly</i>	
EC 1	-	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 2	-	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 3	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 4	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 5	-	-	+	+	-	-	+	-	+
EC 6	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 7	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 8	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 9	-	-	+	-	-	-	-	-	+
EC 12	-	+	+	-	-	+	-	-	+
EC 14	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 15	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 21	+	-	+	+	-	-	+	-	+
EC 22	+	+	+	+	-	-	+	-	+
EC 27	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 28	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 31	-	+	-	-	-	+	-	-	+
EC 32	-	+	-	-	-	+	-	-	+
EC 33	-	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 42	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 47	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 52	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 54	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 55	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 56	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EC 57	+	+	-	+	-	-	+	-	+
EC 58	+	-	-	+	-	-	-	-	+
EC 59	+	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 62	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 64	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 65	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 66	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 67	+	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 69	+	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 72	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EC 81	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EC 88	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 94	-	+	+	+	-	-	+	-	+
EC 95	+	+	-	-	-	+	-	-	+
EC 107	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 110	+	+	-	+	-	-	+	-	+
EC 112	+	+	-	-	-	-	-	-	+
EC 116	+	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 122	+	+	-	+	-	+	+	-	+
EC 125	+	+	-	-	-	+	-	-	+
EC 127	+	-	-	-	-	-	-	-	+

(continua)

TABELA 4: continuação

Estirpe	Genes de virulência								leucócitos
	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf</i>	<i>hly</i>	
EC 225	+	+	+	-	-	-	-	-	+
EC 226	+	-	+	+	-	-	+	-	+
EC 227	-	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 228	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 229	-	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 230	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 231	+	-	-	+	-	-	+	-	+
EC 232	-	-	-	-	-	-	-	-	+
EC 234	-	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 235	-	+	-	+	-	-	-	-	+
EC 236	+	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 238	+	-	-	-	-	+	-	-	+
EC 13	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 16	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 17	-	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 18	-	+	+	+	-	-	+	-	+++
EC 19	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 20	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 23	+	-	+	-	-	-	+	-	+++
EC 25	+	-	-	-	-	+	+	-	+++
EC 26	+	-	-	+	-	-	+	-	+++
EC 29	-	+	-	+	-	-	-	-	+++
EC 30	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 34	-	+	-	-	-	+	-	-	+++
EC 35	+	+	+	-	-	+	-	-	+++
EC 36	-	-	-	+	-	+	+	-	+++
EC 37	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
EC 38	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 39	+	+	-	+	-	-	+	+	+++
EC 40	+	+	-	+	-	-	+	+	+++
EC 41	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 43	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 44	-	+	+	+	-	+	-	+	+++
EC 45	+	+	+	+	-	+	-	-	+++
EC 46	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 48	+	+	+	-	-	-	+	-	+++
EC 49	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 50	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 51	+	-	+	+	-	+	-	-	+++
EC 53	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 60	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
EC 61	+	+	+	-	-	-	-	-	+++
EC 63	+	-	-	-	+	+	-	-	+++
EC 68	+	+	+	-	-	+	-	-	+++
EC 70	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 71	+	+	-	-	+	+	-	-	+++

(continua)

TABELA 4: continuação

Genes de virulência									
Estirpe	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf</i>	<i>hly</i>	leucócitos
EC 73	+	-	-	+	-	+	+	-	+++
EC 74	+	+	+	-	-	+	-	+	+++
EC 75	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
EC 76	+	-	-	-	+	+	-	-	+++
EC 77	+	-	-	+	-	-	-	-	+++
EC 78	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 79	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 80	+	-	+	+	-	-	+	-	+++
EC 82	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 83	-	+	+	-	-	-	-	-	+++
EC 85	+	+	-	-	-	-	-	-	+++
EC 86	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 87	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 89	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 90	+	+	+	+	-	+	-	+	+++
EC 91	+	-	+	-	-	-	-	-	+++
EC 92	+	+	+	+	-	+	-	+	+++
EC 93	-	+	-	+	-	+	-	-	+++
EC 96	+	-	-	-	+	+	-	-	+++
EC 97	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 98	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 99	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 100	+	+	-	+	+	+	+	-	+++
EC 101	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 103	-	+	-	+	-	-	+	-	+++
EC 104	+	+	-	+	-	-	+	-	+++
EC 105	+	+	+	+	-	+	+	+	+++
EC 106	-	+	-	+	-	-	-	-	+++
EC 108	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 109	+	+	-	-	-	+	-	-	+++
EC 111	+	+	-	+	-	-	-	-	+++
EC 113	+	-	-	-	+	+	-	-	+++
EC 114	+	+	-	-	-	+	-	-	+++
EC 115	+	+	-	+	+	+	-	-	+++
EC 117	+	+	+	+	-	-	+	-	+++
EC 118	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 119	+	-	-	+	-	+	-	-	+++
EC 120	+	+	-	+	-	+	+	-	+++
EC 121	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 123	+	+	-	+	-	-	-	-	+++
EC 126	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 128	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 132	+	+	+	-	-	-	-	-	+++
EC 133	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 134	+	+	+	-	+	+	-	+	+++
EC 135	+	-	+	+	-	-	+	-	+++
EC 137	+	-	+	+	-	+	+	-	+++

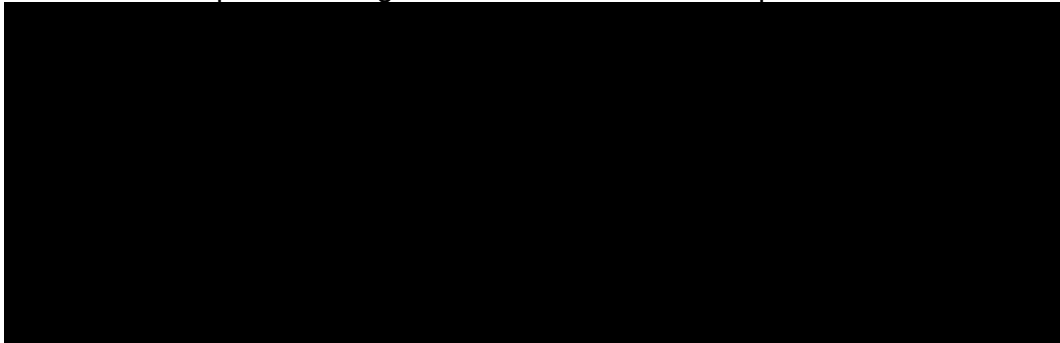
(continua)

TABELA 4: continuação

Genes de virulência									
Estirpe	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf</i>	<i>hly</i>	leucócitos
EC 140	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 144	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 145	+	+	+	-	-	+	-	+	+++
EC 146	+	-	+	+	-	-	+	-	+++
EC 147	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 148	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 150	+	-	+	-	-	-	-	-	+++
EC 157	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 158	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 159	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 160	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 161	-	+	-	-	-	+	-	-	+++
EC 162	-	+	+	+	-	+	+	+	+++
EC 170	+	-	+	-	-	+	-	-	+++
EC 171	+	-	-	-	-	+	-	-	+++
EC 172	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
EC 173	+	-	-	-	-	-	-	-	+++
UPEC2	+	+	+	-	-	+	-	+	+++
UPEC3	-	+	+	+	-	+	+	-	+++

A tabela 5 mostra a frequência dos genes de virulência encontrados nas 204 estirpes de UPEC.

TABELA 5: Frequência dos genes de virulência nas estirpes de UPEC.



Legenda: *traT* (proteína associada a resistência sérica) ; PAI (marcador para a ilha de virulência); *pap* (pili associado a pielonefrite); *sfa* (fímbria S); *afa* (adesina afimbrial); *aer* (sideróforo aerobactina); *cnf1* (fator necrotizante citotóxico do tipo 1); *hly* (alfa-hemolisina).

Vinte (9,8%) das UPEC apresentaram resultado negativo para todos os genes de virulência pesquisados.

Os genes de virulência detectados com maior frequência foram *traT*, em 76% das estirpes, e o sideróforo aerobactina (*aer*), em 41,2% das das UPEC.

Em 27 (13,2%) estirpes foi detectada a presença de dois ou mais genes associados a diferentes estruturas fimbriais.

A figura 3 mostra as correlações estatisticamente significativas presentes entre os genes de virulência entre si e o número de leucócitos presentes nas amostras de urina das quais as estirpes foram isoladas.

	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf1</i>	<i>Hly</i>	Leu
<i>TraT</i>	NA								
PAI	-	NA							
<i>Pap</i>	-	0.212 p=0.002	NA						
<i>Sfa</i>	-	0.386 p<0.001	0.266 p<0.001	NA					
<i>Afa</i>	-	-	-	-	NA				
<i>Era</i>	-	-	0.214 p=0.002	-	0.255 p<0.001	NA			
<i>cnf1</i>	-	0.227 p=0.001	0.332 p<0.001	0.702 p<0.001	-	-	NA		
<i>Hly</i>	-	0.344 p<0.001	0.317 p<0.001	0.208 p=0.003	-	0.196 p=0.005	-	NA	
Leu	-	0.162 p=0.022	0.218 p=0.002	-	-	0.198 p=0.005	-	0.245 p<0.001	NA

Figura 3. Análise de correlação entre genes de virulência. A correlação e os resultados do teste exato de Fischer, indicando apenas os valores de P significativos, estão representados. Leu = leucócitos

5.3 Perfil de virulência de estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos

Das 77 estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos, 61 (79,2%) apresentaram pelo menos um dos genes de virulência pesquisados. A tabela 6 mostra a distribuição destes genes.

TABELA 6: Distribuição dos genes de virulência em estirpes de *E. coli* isoladas de outras regiões anatómicas.

Estirpe	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf1</i>	<i>hly</i>
217d	-	-	-	-	-	+	-	-
755c	+	-	-	-	-	-	-	-
237d	+	-	-	-	-	+	-	-
86d	+	-	-	-	-	-	-	-
01129c	+	-	-	-	-	-	-	-
172d	-	-	-	-	-	-	-	-
85d	+	-	-	-	+	-	-	-
171d	+	-	-	-	-	-	-	-
49d	+	-	-	-	-	+	-	-
422c	+	-	-	-	-	-	-	-
245d	-	-	-	-	-	-	-	-
190d	+	-	-	-	-	-	-	-
ZMP12	-	-	-	-	-	-	-	-
213d	+	-	-	-	-	+	-	-
ACScol	+	-	-	-	-	-	-	-
141d	+	-	-	-	-	-	-	-
239d	+	-	-	-	-	-	-	-
ci39	-	-	-	-	-	-	-	-
216d	-	-	-	-	-	-	-	-
10d	-	-	-	-	-	-	-	-
103	+	-	-	-	-	+	-	-
422	+	-	-	-	-	+	-	-
77d	-	-	-	-	-	-	-	-
75d	+	-	-	-	+	-	-	-
107cs	+	-	-	-	-	-	-	-
62cs	-	-	-	-	-	-	-	-
21cs	+	-	-	-	-	+	-	-
173cs	-	-	-	-	-	+	-	-
78cs	-	-	-	-	-	+	-	+
65cs	+	-	-	-	-	+	-	-
179cs	+	-	-	-	-	+	-	-
226cs	+	-	-	-	+	+	-	-
191cs	-	-	-	-	-	-	-	-
18cs	-	-	-	-	-	-	-	-
62cs	-	-	-	-	-	-	-	-
375	-	-	-	-	-	-	-	-
spc ial	+	-	-	-	-	+	-	-
150cs	+	-	-	-	-	+	-	-
66cs	-	-	-	-	-	-	-	-
56cs	-	-	+	+	-	-	-	-
195cs	-	+	-	+	-	-	-	-
107cs	+	-	-	-	-	-	-	-
88cs	-	-	-	-	-	-	-	-
EC 10	-	-	-	+	-	-	-	-
EC 24	+	-	+	-	-	+	-	-
EC 102	+	+	-	+	-	+	+	-
EC 124	+	+	-	-	-	+	-	-
EC 129	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 130	+	-	-	-	-	-	-	-

(continua)

TABELA 6: continuação

Estirpe	<i>traT</i>	PAI	<i>pap</i>	<i>sfa</i>	<i>afa</i>	<i>aer</i>	<i>cnf1</i>	<i>Hly</i>
EC 131	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 156	-	-	-	-	-	-	-	-
EC 163	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 164	+	+	-	+	-	-	-	-
EC 165	+	-	-	-	-	+	-	-
EC 167	+	+	+	-	-	-	-	-
EC 169	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 176	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 180	+	-	-	-	+	+	-	-
EC 181	-	-	-	-	-	-	-	-
EC 183	+	+	-	-	-	+	-	-
EC 184	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 185	+	+	-	-	-	-	-	-
EC 190	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 191	+	-	-	-	-	+	-	-
EC 196	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 200	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 203	+	-	-	-	-	+	-	-
EC 204	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 205	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 208	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 209	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 211	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 216	+	-	-	-	-	-	-	-
EC 217	+	-	-	-	-	+	-	-
EC 218	+	-	-	-	-	+	-	-
EC 233	-	+	-	+	-	+	-	-
EC 237	+	-	-	+	+	+	-	-

Dezesseis dessas bactérias (20,8%) apresentaram resultado negativo para todos os genes de virulência pesquisados.

Os fatores de virulência detectados com maior frequência nessas estirpes de *E. coli* foram *traT* (70,1%) e o sideróforo aerobactina (*aer*), em 33,8% das bactérias.

A tabela 7 mostra a frequência dos genes de virulência encontrados nessas estirpes de *E.coli*.

TABELA 7: Frequência dos genes de virulência detectados por PCR em outras estirpes de *E. coli*.



A figura 4 mostra a comparação da frequência dos genes de virulência entre as estirpes de UPEC e as estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos.

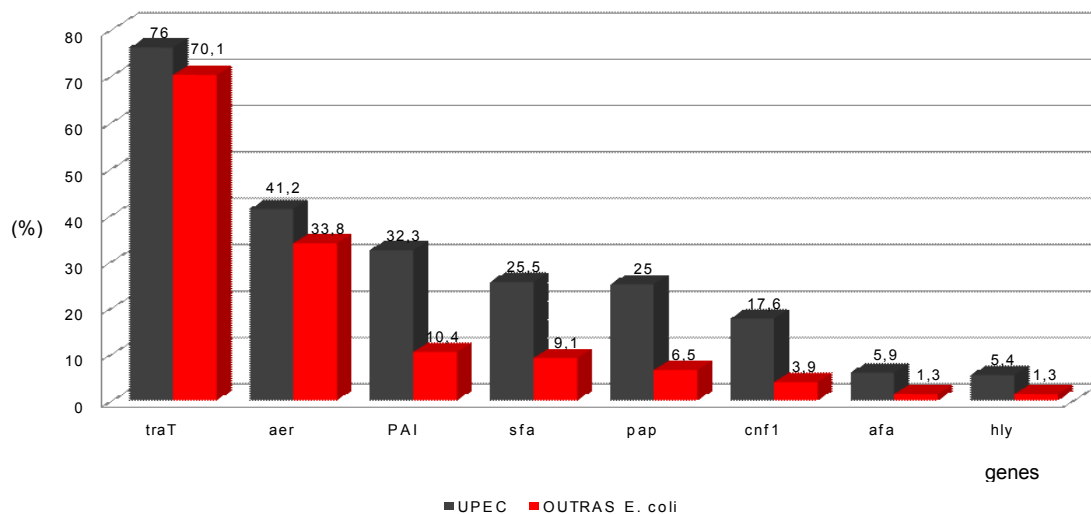


Figura 4: Frequência dos genes entre as estirpes de UPEC e outras *E. coli*.

5.4 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado apenas para as estirpes de *E. coli* isoladas de urina. Cento e vinte (58,8%) das estirpes mostraram resistência a um ou mais antimicrobianos.

A prevalência de resistência antimicrobiana foi a seguinte: ampicilina 51%, sulfametoxazol-trimetoprim 44,1%, ácido nalidíxico 21,1%, gentamicina 15,7%, ciprofloxacina 12,7%, cefalotina 4,4%, cefoxitina 1%, amoxicilina-ácido

clavulânico 1%, ceftriaxona 1%, aztreonam 0,5%, cefepime 0,5% e imipenem 0,5%. Estes dados estão indicados na figura 5.

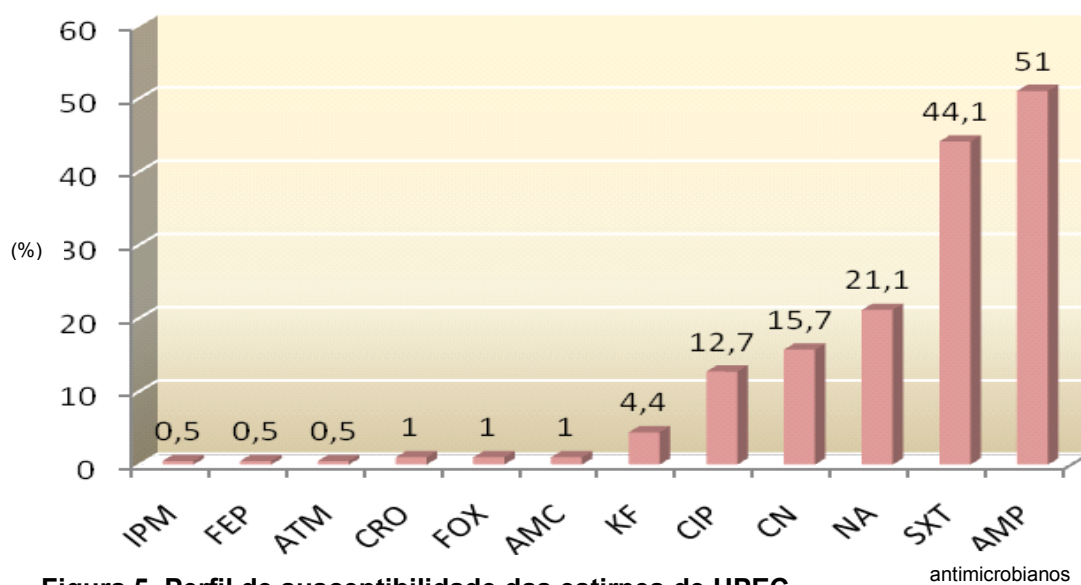


Figura 5. Perfil de susceptibilidade das estirpes de UPEC.

Legenda: IPM: imipenem; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; CRO: ceftriaxona; FOX: cefoxitina; AMC: amoxicilina-clavulanato; KF: cefalotina; CIP: ciprofloxacino; CN: gentamicina; NA: ácido nalidíxico; SXT: sulfametoxazol-trimetoprim; AMP: ampicilina.

O perfil de resistência frente aos antimicrobianos está indicado na Tabela 8.

TABELA 8: Perfis de resistência aos antimicrobianos encontrados em estirpes de UPEC.

Antimicrobianos	Nº de estirpes
Ácido nalidíxico	1
Ampicilina	16
Cefalotina	2
Sulfametoxazol-trimetoprim	6
Gentamicina	6
Ácido nalidíxico/Ampicilina	1
Ciprofloxacino/Ampicilina	1
Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim	36
Gentamicina/Sulfametoxazol-trimetoprim	1
Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim/Gentamicina	6
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina	2
Ácido nalidíxico/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim	11
Ampicilina/Cefalotina/Sulfametoxazol-trimetoprim	5
Ácido nalidíxico/Ampicilina/Gentamicina	1
Ácido nalidíxico/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim/Gentamicina	4
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim	5
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Gentamicina	1
Ácido nalidíxico/Ampicilina/Cefalotina/Sulfametoxazol-trimetoprim	1
Ácido nalidíxico/Cefoxitina/Ampicilina/Amoxicilina-ácido clavulânico/Gentamicina	1
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Ceftriaxona/Gentamicina	1
Ácido nalidíxico/Cefoxitina/Ciprofloxacino/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim	1
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim/Gentamicina	6
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Cefalotina/Sulfametoxazol-trimetoprim	2
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Amoxicilina-ácido clavulânico/Sulfametoxazol-trimetoprim/Gentamicina	1
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Sulfametoxazol-trimetoprim/Gentamicina/Imipenem	1
Ácido nalidíxico/Ciprofloxacino/Ampicilina/Cefepime/Gentamicina/Cefalotina/Ceftriaxona/Sulfametoxazol-trimetoprim/Aztreonam	1

5.5 Produção de hemolisina

Os resultados obtidos na verificação da produção de hemolisina estão demonstrados na Tabela 9. Deste modo, das 10 estirpes positivas para o gene *hly*, detectado através da técnica PCR, apenas 2 não foram capazes de provocar hemólise significativa (estirpes 39 e 40). As outras 8 estirpes produziram hemolisinas em quantidade suficiente para causar hemólise

significativa em eritrócitos humanos (estirpes 44, 74, 90, 92, 105, 134, 145 e 162).

TABELA 9. Hemólise induzida pelas estirpes de UPEC em eritrócitos humanos.

Estirpe	% Hemólise
Controle negativo	3,46 ± 0,14
Controle <i>hly</i>-negativo	4,10 ± 0,80
39	11,6 ± 0,67
40	12,63 ± 0,76
44	50,4 ± 5,51 ***
74	34,49 ± 1,69 ***
90	21,87 ± 2,4 ***
92	24,7 ± 3,21 ***
105	64,2 ± 13,24 ***
134	16,97 ± 2,4 **
145	41,6 ± 2,99 ***
162	41,6 ± 2,24 ***
** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado com o controle negativo	

A suspensão eritrocitária foi incubada com as bactérias coletadas após 2, 3, 4, 5 e 6 horas de cultura sob agitação constante e apenas os picos de hemólise para cada estirpe foram representados na tabela. Os resultados foram expressos como a média ± o desvio padrão da média e analisados estatisticamente por ANOVA. A diferença estatística foi confirmada pelo pós-teste de Tukey.

A maior produção de hemolisina ocorreu entre os tempos de 3 e 4 horas de cultivo bacteriano (Figura 4), já nos períodos de 2, 5 e 6 horas o cultivo bacteriano não foi capaz de induzir hemólise significativa (resultados não representados). Algumas estirpes apresentam picos bastante específicos de produção de hemolisina. A UPEC 44 induziu a ocorrência de hemólise intensa com 3 horas de cultivo (50,4% ± 5,51) e hemólise não significativa com 4 horas de cultivo (8,1% ± 0,48), assim como a UPEC 74, 6,0% ± 0,65 com 3 horas de cultivo e 34,49% ± 1,69 de hemólise com 4 horas de cultivo bacteriano. Estes resultados estão de acordo com outros estudos sobre hemolisinas de *E. coli*, que demonstram que a síntese dessas enzimas apresentam picos de concentração sendo inativadas posteriormente.

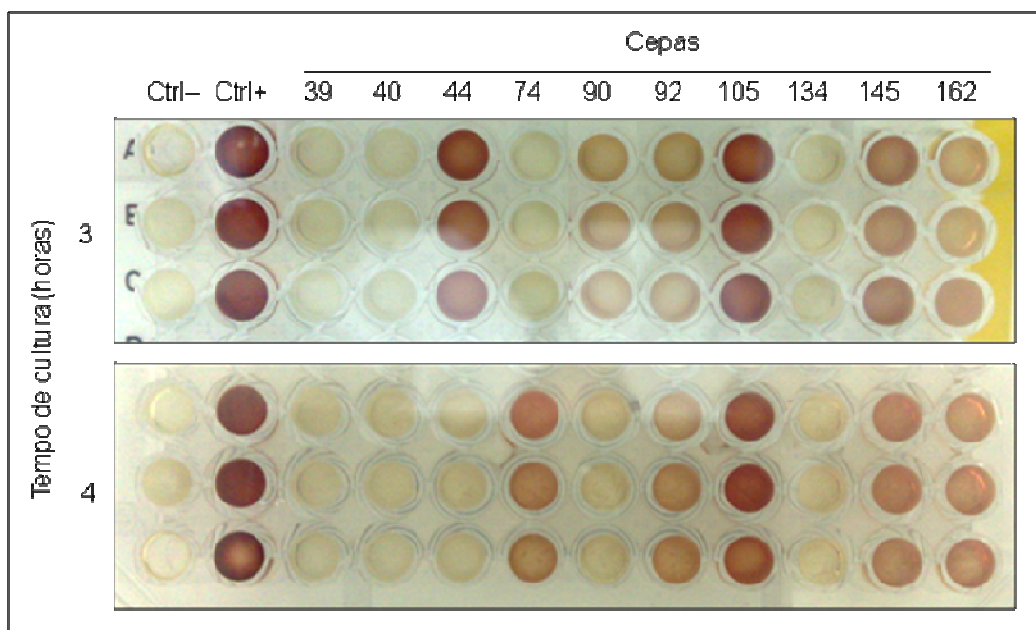


Figura 6. Hemólise induzida em eritrócitos humanos pelas culturas de *E. coli* após 3 e 4 horas de crescimento. A figura representa placas de 96 poços contendo os sobrenadantes das incubações de eritrócitos humanos com as culturas de *E. coli*. Ctrl-: sobrenadante da incubação de eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (BHI) apenas. Ctrl+: sobrenadante da incubação dos eritrócitos com meio de cultivo bacteriano (BHI) e 0,1% de Triton X-100.

5.6 Adesão de estirpes de UPEC em células HeLa

A adesão de micro-organismos é considerado o primeiro passo e um pré-requisito para ocorrência de colonização dos tecidos do hospedeiro e um evento que precede a invasão e infecção (SVANBORG et al, 1983; JOHNSON, 1991).

Com o intuito de verificar se as estirpes de UPEC possuem características de virulência das *E. coli* diarréiogênicas, 35 estirpes que apresentaram diferentes perfis genotípicos em relação às adesinas foram analisadas quando a sua capacidade de aderir em células epiteliais HeLa. Das 35 estirpes, 9 apresentaram padrão de aderência agregativa (AA), característica da *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Figura 5). Outras 9 estirpes de UPEC apresentaram padrão de aderência difusa (DA), característica de *E. coli* (DAEC) que adere difusamente (Figura 6). Estirpes com o padrão de aderência localizada (LA) não foram observadas. Dentre as outras 14 cepas remanescentes, 13 apresentaram adesão esporádica, esparsa ou não

característica, 1 não aderiu sobre a superfície das células HeLa e 3 estirpes causaram a perda de adesão de todas as células e seus padrões de adesão não puderam ser observados (Tabela 10). Quatro estirpes estimularam a perda de adesão celular das células HeLa em relação ao seu substrato (UPEC 5, 21, 57, 100).

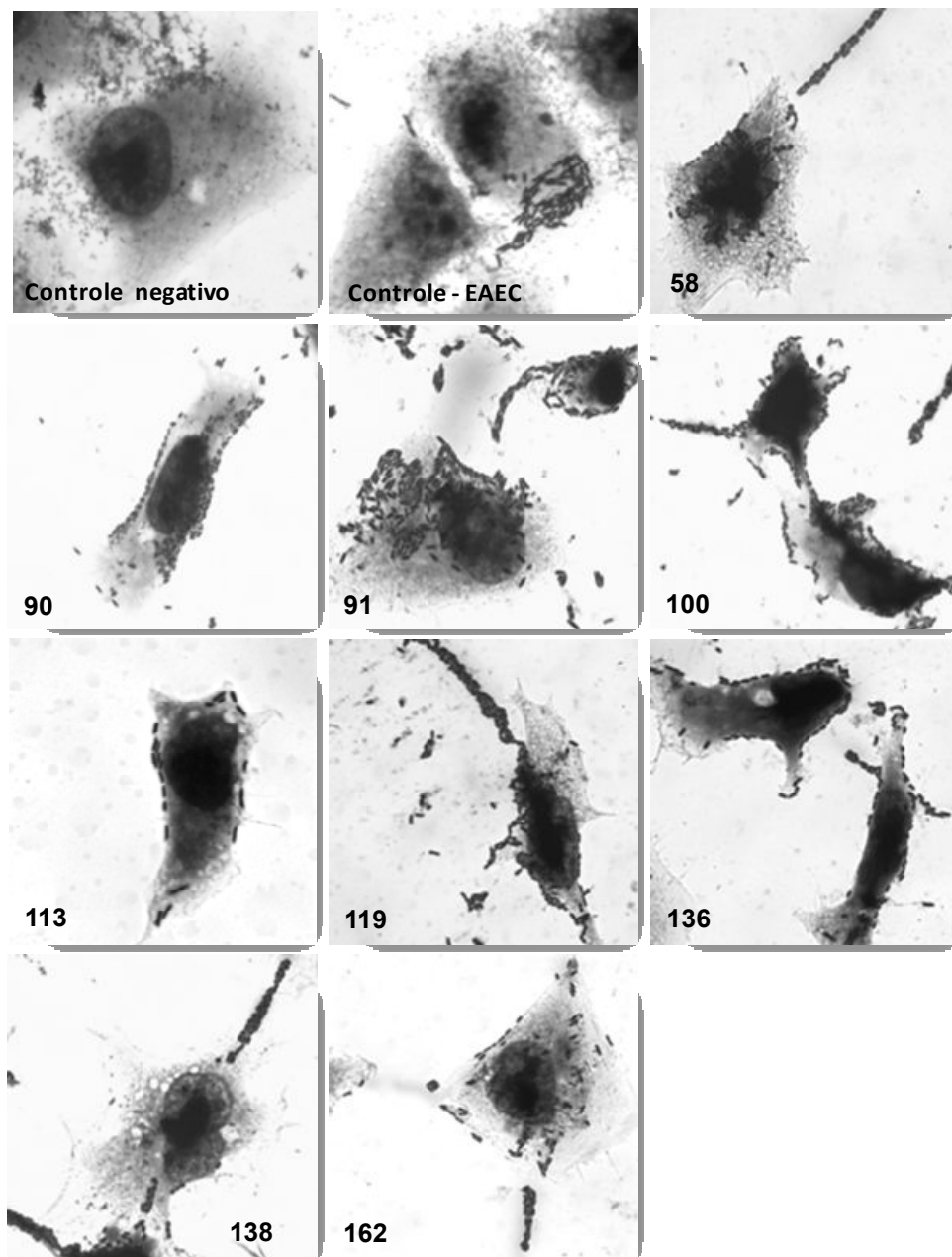


Figura 7. Padrão de adesão agregativo (AA) sobre células da linhagem HeLa. Das 34 estirpes testadas 9 apresentaram padrão agregativo, característico de *E. coli* diarréiogênica enteroagregativa (EAEC). Os números nas figuras representam as estirpes de UPEC testadas. O controle EAEC representa incubações utilizando estirpe padrão diarréiogênica enteroagregativa (EAEC) com perfil de adesão agregativo conhecido.

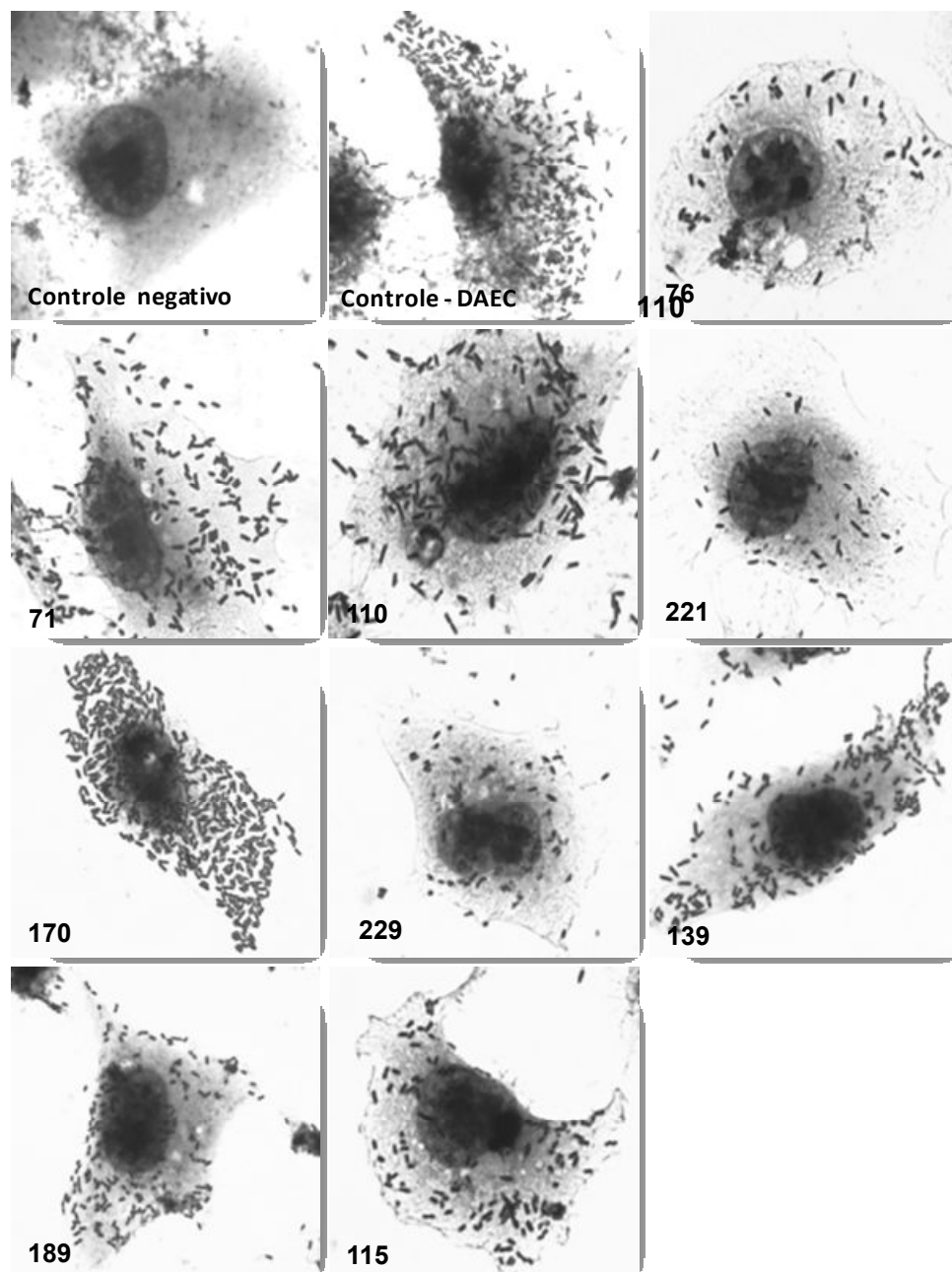


Figura 8. Padrão de adesão difuso (DA) sobre células da linhagem HeLa. Das 34 estirpes testadas 9 apresentaram padrão difuso, característico de *E. coli* diarreio gênica que adere difusamente (DAEC). Os números nas figuras representam as estirpes de UPEC testadas. O controle negativo representa as células incubadas apenas com o meio de cultura. O controle DAEC representa incubações utilizando estirpes padrão com perfil de adesão difuso conhecido.

TABELA 10. Perfis de adesão em células HeLa de 35 estirpes de UPEC.

Tipo de interação com as células HeLa	Estirpes
Padrão agregativo (AA)	58, 90, 91, 100, 113, 119, 136, 138, 162
Padrão de aderência difusa (DA)	71, 76, 110, 115, 139, 170, 189, 221, 229,
Adesão não característica	9, 12, 22, 23, 57, 77, 80, 94, 96, 120, 134, 194, 235
Ausência de aderência	201
Indução de perda de adesão	5, 21, 100

A tabela 10 mostra os genes de virulência presentes nas estirpes analisadas quanto à capacidade de interagir com células HeLa. Com exceção de *hly* (presente em apenas 1 estirpe), os demais genes associados com virulência em UPEC estão representados nas estirpes que apresentaram os distintos padrões de interação com as células HeLa.

TABELA 11: Genes de virulência associados com diferentes estirpes de UPEC de acordo com seus fenótipos de interação com as células HeLa.

Genes de n (%) estirpes de UPEC expressando	diferentes fenótipos em HeLa		
Virulência	DA	AA	DC
<i>traT</i>	6 (67)	8 (72)	3 (75)
<i>PAI</i>	5 (55)	5 (45)	1 (25)
<i>pap</i>	3 (33)	6 (54)	2 (50)
<i>sfa</i>	4 (44)	7 (63)	4 (100)
<i>afa</i>	5 (55)	1 (09)	1 (25)
<i>aer</i>	7 (77)	6 (54)	1 (25)
<i>cnf1</i>	1 (11)	4 (36)	4 (100)
<i>hly</i>	0	1 (09)	0

DA: aderência difusa; AA: aderência agregativa; DC: desadesão celular das células HeLa induzida pela presença das estirpes de UPEC.

6. DISCUSSÃO

6.1. Virulência em UPEC

As infecções do trato urinário são uma das doenças infecciosas mais comuns, sendo *E. uropatogênica* (UPEC) o patógeno mais frequente (SOBEL & DONALD, 2005).

As estirpes de UPEC estudadas neste trabalho foram caracterizadas quanto à presença de genes associados com virulência utilizando o sistema de PCR multiplex proposto por Yamamoto e colaboradores (1995), para a detecção de *pap*, *sfa* e *afa*, genes que codificam respectivamente para as adesinas P e S, e a adesina afimbrial Afa; *hly* e *cnf1*, respectivamente para as toxinas alfa-hemolisina e fator necrotizante citotóxico; e *aer* que codifica o sideróforo aerobactina, associado com a aquisição de ferro. Outros dois pares de iniciadores descritos por Johnson & Stell (2000), *traT* associado com resistência ao soro, e PAI um marcador para a ilha de virulência descrita na estirpe CFT073, foram utilizados em um sistema de PCR duplex.

Os resultados obtidos (Tabela 4) mostram que 90,2% das estirpes de UPEC analisadas apresentaram um ou mais fatores de virulência envolvidos na patogênese da ITU.

SANTOS et al (2009) encontraram alta prevalência dos genes *traT* e *aer*, detectados em mais de 60% das estirpes. Esses dados são condizentes com os encontrados neste trabalho, no qual a presença do gene *traT* foi detectada em 76,2% das UPEC; entretanto a prevalência de *aer* foi 40,6%, inferior ao relatado por Santos e colaboradores (2009), mas similar ao descrito por outros autores (ABE et al., 2008). A elevada frequência de *traT* não surpreende uma vez que o produto desse gene, TraT, uma proteína de membrana externa, desempenha um papel na resistência ao soro. Essa característica é importante para prevenir a destruição de patógenos pelo complemento, e para a sua persistência nos fluidos e órgãos do hospedeiro (MELLATA et al., 2003). Em relação à frequência de *aer*, a expressão de sistemas de aquisição de ferro é essencial para a colonização e persistência de bactérias no trato urinário, onde a limitação da disponibilidade de ferro é um importante fator de defesa do hospedeiro (RUSSO et al., 1999; WILES et al., 2008). A importância dessa característica pode ser demonstrada pela existência de vários sistemas

diferentes de aquisição de ferro que são expressos em UPEC (SNYDER et al., 2004). Em 61,3% das amostras analisadas não foi encontrado o gene que codifica para o sideróforo aerobactina (*aer*), sugerindo que estas estirpes expressam outros sistemas para a aquisição de ferro, visto a necessidade deste elemento para o crescimento bacteriano.

A adesão às células do hospedeiro é considerada um fator primordial para o início da infecção pelas estirpes bacterianas. Um único patógeno pode fazer uso de várias adesinas, com afinidade por diferentes receptores específicos, o que confere vantagem de adaptação do patógeno a diferentes tecidos do hospedeiro no início da infecção (ANTÃO et al, 2009).

SANTOS et al (2009) encontraram prevalência dos genes *afa* e *sfa* que codificam para as adesinas S e Afa em menos de 20% das estirpes analisadas. No presente a presença dos genes *afa* e *sfa*, foi detectada em 5,9% e 25,2% das estirpes, respectivamente. E o gene *pap*, que codifica para a adesina P, foi detectado em 25% das estirpes. A frequência de *pap* e *sfa* em estirpes de UPEC é bastante variável dependendo do grupo filogenético a que pertencem e da clínica do paciente do qual foram isoladas. Frequências de *sfa* variando de 0 a 64%; e *pap* de 0 a 54% já foram relatadas (BLANCO et al., 1997a; SANTO et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006, 2009). Uma correlação positiva estatisticamente significativa foi encontrada entre *sfa* e *pap* (0,266; $p < 0.001$) (Figura 1), que foram encontrados associados em 11% das estirpes. Esta associação também foi encontrada no trabalho de Johnson & Stell (2000).

O gene *afa* apresentou a menor frequência entre os que codificam adesinas. Frequências variando de 0 a 12,5% tem sido descritas para esse gene (BLANCO et al., 1997a; JOHNSON & STELL, 2000; SANTO et al., 2006; TAKAHASHI et al., 2006; ABE et al., 2008) indicando que apresenta uma baixa prevalência entre as UPEC.

Entre os genes que codificam para as toxinas, *cnf1* apresentou maior prevalência entre as UPEC, 18%, enquanto que *hly* foi detectado em apenas 4,9% das estirpes, todas pertencendo ao grupo 2. Também foi observada ampla variação (0 – 32% para *cnf1* e 0 – 44% para *hly*) na prevalência desses genes entre as estirpes de UPEC de acordo com o grupo filogenético, apresentação clínica do paciente e localização geográfica (BLANCO et al.,

1997b; JOHNSON e STELL, 2000; TAKAHASHI et al., 2006, 2009; ABE et al., 2008).

Johnson & Stell (2000) relataram em seu trabalho a associação do gene *cnf1* com o gene *pap*. Neste trabalho foram encontradas 20 amostras *cnf1*⁺ *pap*⁺. Uma correlação positiva de 0,332 ($p < 0.001$) foi encontrada para esses genes (Figura 1). Outra associação positiva envolvendo *cnf1* e genes que codificam para adesinas foi observada com *sfa* (0,702, $p < 0,001$; figura 1).

A prevalência de PAI, marcador da ilha de virulência PAI_{CFT073} I, foi de 33%, dentro dos valores encontrados por Johnson & Stell (2000), que variaram de 26 a 90%, dependendo da classe filogenética da bactéria.

Entre as estirpes estudadas no presente trabalho, 10 (4,9%) apresentaram o gene que codifica para a hemolisina (*hly*). Destas, 8 foram *pap*⁺ (80%) e 4 *cnf1*⁺ (40%), conforme ilustrado na tabela 3. Uma ou mais ilhas de patogenicidade foram descritas nas estirpes de UPEC CFT073, J96, 536 e UTI89, e associações entre os genes *pap*, *hly* e *cnf1* e/ou *sfa* estão presentes em algumas delas (GUYER et al., 1994; OELSCHLAEGGER et al., 2002; WELCH et al., 2002; LLOYD et al., 2007; WILES et al., 2008). Dessa forma, os achados descritos acima podem indicar a presença de ilhas de virulência nas respectivas estirpes.

As estirpes uropatogênicas EC 44, EC 74, EC 90, EC 92, EC 105, EC 134, EC 145 e EC 162 apresentaram o fenótipo PAI/*pap/aer/hly*, perfil este encontrado na estirpe CFT073, protótipo de UPEC, a qual possui uma ilha de virulência que alberga estes três genes (WELCH et al, 2002).

A α -hemolisina é um fator de virulência presente em diversas estirpes causadoras de infecções extraintestinais. Esta proteína pode induzir a lise osmótica de eritrócitos devido à atividade de formação de poros, e é citotóxica a diversos tipos de células humanas. Apesar de outros tipos de hemolisinas terem sido descritas, como por exemplo a beta-hemolisina, a prevalência e significado clínico destas outras enzimas é pouco conhecida (JOHNSON, 1991; 2003). A alfa-hemolisina é uma exotoxina capaz de induzir o influxo de Ca^{++} e a eventual lise de uma variedade de tipos celulares em diferentes hospedeiros (WELCH & BAUER, 1995), sendo capaz de lisar os eritrócitos de todos os mamíferos. Além da lise de eritrócitos, a alfa-hemolisina é tóxica para uma grande variedade de tipos celulares e contribui para indução de inflamação,

injúria tissular e debilidade das defesas do organismo, sendo relacionada a citotoxicidade de isolados clínicos de *E. coli* (JOHNSON, 1991; 2003). Dentre as estirpes estudadas nesse trabalho, 10 foram positivas para a presença do gene *hly*. O ensaio biológico realizado para detectar a capacidade das estirpes de *E. coli* em induzir hemólise demonstrou que dessas 10 estirpes, 8 foram capazes de induzir hemólise significativa quando incubadas com eritrócitos humanos. Apesar de 2 estirpes (39 e 40) não serem capazes de induzir hemólise significativa estatisticamente, elas apresentaram uma tendência à esse evento (11,6 e 12,63%) quando comparada com o controle negativo (3,46%). A ausência de hemólise detectável não significa que hemolisinas não tenham sido expressas pela bactéria. Estudos tem demonstrado que é necessária a produção de grande concentração de hemolisinas para que o evento de hemólise venha a ocorrer (SCHEFFER et al, 1988; JOHNSON, 1991).

O ensaio de hemólise demonstrou que as estirpes de *E. coli* sintetizam hemolisinas em determinados períodos de tempo de cultivo. Os níveis mais intensos de hemólise foram observados quando culturas de 3 e 4 horas foram utilizadas na incubação com os eritrócitos. Culturas bacterianas com tempos inferiores e superiores a esses não foram capazes de induzir hemólises significantes. Esses resultados estão de acordo com outros estudos da literatura que demonstraram que *E. coli* produzem hemolisinas em determinados picos durante a fase log, inativando-as posteriormente na fase lag (JOHNSON, 1991). O meio utilizado no cultivo das estirpes de *E. coli* também foi um fator determinante para expressão de hemolisinas. As estirpes de *E. coli hly+* foram cultivadas em caldo TSB, e nenhum indício de hemólise pode ser detectado quando culturas de 2, 3, 4, 5, 6 e 8 horas foram incubadas com eritrócitos humanos frescos (resultados não mostrados). Quando cultivadas em caldo BHI, as mesmas bactérias foram capazes de induzir hemólise significativa como descrito anteriormente. A atividade da alfa-hemolisina é fortemente dependente da composição do meio de cultura (MACKMAN et al, 1986), e é expressa quando as cepas são cultivadas em meios contendo caldo de carne ou infusão de coração (SMITH, 1963; SNYDER & KOCH, 1966). Em duas estirpes *hly* positivas não foi verificada produção significativa dessas toxinas nos tempos utilizados nos ensaios de hemólise. Isto

poderia ser explicado pela produção da toxina em outros períodos de tempo que não os utilizados neste trabalho.

Em relação à presença e distribuição dos genes associados com virulência, vários perfis distintos foram encontrados nas estirpes de UPEC (Tabela 4), o que também foi observado em outros estudos (BLANCO et al., 1997; JOHNSON e STELL, 2000; MARRS et al., 2002). Uma alta heterogeneidade foi detectada em relação aos genes presentes nas estirpes. Com exceção daquelas que continham apenas o gene *traT* (51 estirpes, 25%), ou a associação *traT aer* (21 estirpes, 20%), apenas algumas poucas compartilharam um mesmo perfil de virulência (Tabelas 4 e 5). Achados similares foram relatados por MARRS et al. (2002), que encontraram poucos perfis comuns a 5 - 10% das UPEC analisadas.

Uma diferença significativa foi encontrada entre os 2 grupos de UPEC. Um maior grau de virulência ($p = 0,005$) foi detectado nas UPEC do grupo 2, associado com intensa leucocitúria, o que pode ser inferido pelo maior número de estirpes que apresentaram 4 ou mais genes de virulência, enquanto no grupo 1 predominam estirpes com apenas 1 gene de virulência ($p = 0.0028$). Apesar disso, exceto por *hly* que foi encontrado apenas entre as UPEC do grupo 2, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada na distribuição dos genes de virulência entre as UPEC de ambos os grupos.

Em relação a CVD432, marcador para EAEC que não foi detectado em nenhuma das UPEC analisadas, os resultados são discordantes daqueles encontrados por Abe e colaboradores (2008). Esses autores relataram características daquelas estirpes diarreiogênicas de *E. coli* em 3,6% das UPEC e propõem que algumas EAEC poderiam ser potenciais uropatógenos. Estas discrepâncias poderiam ser explicadas pela perda ou heterogeneidade dos plasmídeos pCVD432 de EAEC, onde está localizada a sequência CVD432, nas UPEC analisadas no presente trabalho. A outra possibilidade é que as estirpes aqui analisadas sejam distintas daquelas estudadas por ABE et al. (2008), e não contenham o plasmídeo associado com EAEC.

No entanto, quando ensaios de cultivo celular foram utilizados para avaliar se 35 estirpes UPEC, representativas dos principais genótipos de virulência encontrados neste trabalho, eram capazes de apresentar fenótipos de adesão associados com as estirpes diarreiogênicas DAEC (adesão difusa)

ou EAEC (adesão agregativa), foi observado que 9 apresentaram padrão de aderência agregativa (AA) (Figura 7). Outras 9 estirpes de UPEC apresentaram padrão de aderência difusa (DA), (Figura 8). Estes resultados sugerem a presença de possíveis marcadores de DAEC e EAEC, e essas estirpes de UPEC devem ser analisadas frente a outros marcadores de virulência de *E. coli* diarreiogênicas para esclarecer esse comportamento.

6.2. Genes de virulência em *E. coli* isoladas de outras regiões anatômicas

Os genes de virulência típicos das estirpes de UPEC (*pap*, *sfa*, *afa*, *aer*, *cnf1* e *hly*) também foram detectados nas estirpes de *E. coli* isoladas de outros sítios anatômicos.

Os genes encontrados com maior frequência nestas estirpes foram *traT* e *aer*, em 70,1 e 33,8% das estirpes, respectivamente. Os genes que codificam para as toxinas α -hemolisina e fator necrotizante citotóxico do tipo 1 foram encontrados mais raramente, ambos em 1,3% das amostras (Tabela 7).

O gene *pap* que codifica a fímbria P, associada principalmente a quadros de pielonefrite, foi encontrado em 36,7% das amostras de UPEC com intensa leucocitúria, 17,3% das estirpes de UPEC com discreta a moderada leucocitúria e em apenas 3,9 % dos outros patótipos de *E. coli*, dados estes compatíveis com os achados por JOHNSON et al (1991).

Os resultados obtidos neste estudo atendem a proposta de Johnson e Russo (2000), de que as amostras isoladas em determinado sítio anatômico podem causar infecção em outros sítios do hospedeiro, devido à plasticidade destas bactérias (DOBRINDT et al, 2010), e por isso o acrônimo ExPEC englobaria todas as amostras de *E. coli* isoladas de infecções extra-intestinais independente do hospedeiro e do sítio de isolamento.

6.3. Resistência a antimicrobianos

O conhecimento do padrão de resistência antimicrobiana é de fundamental importância para a escolha adequada de antibióticos no tratamento das ITU. Além disso, no Brasil ainda são escassos os estudos sobre a resistência antimicrobiana dos uropatógenos.

Atualmente é comum a detecção de linhagens de *E. coli* resistentes a pelo menos duas classes de antibióticos, o que restringe as opções para uma terapia antimicrobiana (VON BAUM & MARRE, 2005). Devido a este fato faz-se importante a realização do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos para estirpes que, como *E. coli*, são aptas a sobreviver em diferentes condições ambientais.

Nos últimos anos tem sido documentada a alta prevalência de resistência a sulfametoxazol-trimetoprim (AGRA, 2007). Neste trabalho o índice de resistência a esta droga foi de 44,5 %.

Com o aumento da resistência aos beta-lactâmicos e ao sulfametoxazol-trimetoprim, as fluoroquinolonas como ciprofloxacina, tornaram-se os antimicrobianos de escolha no tratamento empírico da maioria das ITU não-complicadas (WARREN et al, 1999). Todavia, o elevado uso destas drogas está associado ao aumento da resistência às mesmas (KAHLMETER et al, 2003).

Com relação aos fatores de virulência de uropatógenos, diversos estudos tem mostrado que as estirpes de UPEC resistentes às fluoroquinolonas e quinolonas apresentam reduzida virulência e são menos capazes de causar infecção do trato urinário superior quando comparadas às estirpes susceptíveis, sugerindo que a resistência a estes antimicrobianos pode estar associada à diminuição da presença ou expressão de alguns fatores de virulência, ou ainda à diminuição da patogenicidade destas estirpes (MARTINEZ-MARTINEZ et al, 1999; VILA et al, 2002).

Neste estudo o índice de resistência à quinolona (ácido nalidíxico) foi de 21,3% e à fluoroquinolona (ciprofloxacina) foi 12,9%, dados condizentes com os resultados encontrados por Moreno e colaboradores (2006), de índice de resistência de 21% e 12% para as quinolonas e fluoroquinolonas, respectivamente.

VILA e colaboradores (2002) correlacionaram a ausência do gene *hly* com a não expressão da hemolisina, mostrando que a ausência de hemólise deve-se à perda do gene ao invés da diminuição da expressão, observando-se o mesmo com relação ao gene *cnf1*. Ambos os genes tem sido encontrados em estirpes de UPEC na mesma ilha de virulência (PAI), e estas ilhas de virulência podem ser facilmente e espontaneamente deletadas do cromossomo,

resultando em mutantes com acentuada redução da virulência *in vivo* (HACKER et al, 1997). Estes autores encontraram maior porcentagem de bactérias que expressam hemolisina em estirpes susceptíveis ao ácido nalidíxico em relação às resistentes, dados estes reportados também por Martinez-Martinez et al (1999), os quais mostraram que as estirpes resistentes ao ácido nalidíxico são menos hemolíticas. No presente estudo 80% das estirpes hemolíticas apresentaram susceptibilidade frente ao ácido nalidíxico.

PIATTI et al (2008), relataram a incidência dos genes *pap*, *hly* e *cnf1* em 52%, 56% e 58%, respectivamente, das estirpes susceptíveis a quinolonas, enquanto em estirpes resistentes a incidência foi de 11% para o gene *pap* e 3% para os genes *hly* e *cnf1*. Esta discrepância entre as estirpes resistentes e sensíveis com relação à presença dos genes *pap*, *hly* e *cnf1* pode ser explicada pela perda da PAI correspondente, provavelmente como resultado de uma mutação que levou à resistência (HORCOJADA et al, 2005). Nos isolados urinários analisados no presente trabalho, a incidência dos genes *pap* (17,5%), *hly* (5%) e *cnf1* (10%) em estirpes resistentes poderia estar implicada na perda da PAI II_{J92}. Essa perda das ilhas de patogenicidade (PAIs) pode ter um papel na adaptação de UPEC durante certos estágios da infecção. Por isso, a flexibilidade genética dos micro-organismos patogênicos pode criar vantagens seletivas em relação aos outros, resultando em replicação peculiar no organismo hospedeiro ou outros nichos ecológicos (BLUM et al, 1994). Estudos com *E. coli* 536 demonstraram que esta instabilidade pode ser exacerbada por alguns estímulos (MUDDENDORF et al, 2004), dentre os quais, a presença de quinolonas (LOPEZ et al, 2007), cujas concentrações subinibitórias induzem a perda parcial ou total de PAIs *in vitro* em estirpes de UPEC (SOTO et al, 2006).

A porcentagem de isolados clínicos de *E. coli* não-fimbriados é maior em estirpes resistentes às quinolonas do que em estirpes sensíveis (VILA et al, 2002). Neste estudo, a porcentagem de isolados não-fimbriados foi de 69,2% em estirpes resistentes ao ácido nalidíxico.

No entanto não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição dos genes de virulência entre estirpes resistentes e susceptíveis ao ácido nalidíxico e a ciprofloxacina.

7. CONCLUSÕES

- Dentre as estirpes de UPEC 90,2% apresentaram ao menos um dos fatores de virulência pesquisados.
- A prevalência dos genes de virulência entre as estirpes de UPEC foi *traT* (76%), *aer* (41%), PAI (32%), *sfa* (26%), *pap* (25%), *cnf1* (18%), *afa* (6%) and *hly* (5%). Entretanto, exceto por *hly*, encontrado apenas nas bactérias do grupo 2, não houve diferença significativa na distribuição desses genes entre os grupos.
- A atividade hemolítica significativa em eritrócitos humanos foi detectada em 8 das 10 estirpes positivas para o gene *hly*.
- Elevada heterogeneidade foi observada quanto à distribuição dos genes de virulência entre as UPEC. Cincoenta perfis de virulência foram identificados, destes 20 foram comuns a ambos os grupos; 7 apenas às estirpes do grupo 1 e 23 apenas às do grupo 2.
- Uma diferença significativa foi encontrada entre os 2 grupos de UPEC. Um maior grau de virulência foi detectado no grupo 2, no qual se encontra a maioria das estirpes que apresentaram 4 ou mais genes de virulência, enquanto estirpes com apenas 1 gene de virulência predominam no grupo 1.
- O gene CVD432, marcador para EAEC não foi detectado em nenhuma das UPEC analisadas, entretanto no ensaio de adesão em células HeLa 9 estirpes apresentaram o padrão de aderência agregativa característica daquele patógeno intestinal.
- Das amostras estudadas provenientes de outros sítios anatômicos, 79,2% apresentaram pelo menos um dos fatores de virulência urinários, sendo *traT* e *aer* os mais frequentes, presentes em 70,1 % e 33,8% das amostras, respectivamente.

- Cento e vinte estirpes de UPEC (58,8%) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados, sendo ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e ácido nalidíxico as drogas às quais estas apresentaram maior índice de resistência.

REFERÊNCIAS

ABE, C. M.; SALVADOR, F. A.; FALSETTI, I. N.; VIEIRA, M. A. M. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 52 p. 397-406, 2008.

ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. v.25, n.17, p.3389-3402, 1997.

ANDREWS, S. C. et al. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 27, p. 215–237, 2003.

ANTÃO, E. M.; WIELER, L. H.; EWERS, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Gut Pathogens**. p. 1-22, 2009.

ARANDA, K. R.; FAGUNDES-NETO, U.; SCALETISKY, I. C. Evaluation of multiplex PCR for diagnosis of infection with diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, p. 5849-5853, 2004.

ARSLAN, H.; AZAP, O. K.; ERGÖNÜL, Ö.; TIMURKAYNAK, F. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p.914-918, 2005.

BAGG, A.; NEILANDS, J. B. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. **Biochemistry**. v. 26, p. 471-5477, 1987.

BAHRANI- MOUGEOT, F. K.; PANCHOLI, S.; DAOUST, M.; DONNENBERG, M.S. Identification of putative urovirulence genes by subtractive cloning. **Journal of Infection Diseases**. v. 183, Suppl. 1: S 21-S23, 2001.

BARASCH, J.; MORI, K. Cell biology: iron thievery. **Nature**. v. 432, p. 811–813, 2004.

BEKAL, S.; BROUSSEAU, R.; MASSON, L.; PREFONTAINE, G.; FAIRBROTHER, J.; HAREL, J. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, p. 2113–2125, 2003.

BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, B.; WULLT, I.; LEIJONHUFVUD, H.; FISCHER, H.; SVANBORG, C. PapG-dependent adherence breaks mucosal inertia and triggers the innate host response. **Journal of Infection Diseases**. v. 189, p. 1734-1742, 2004.

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; ALONSO, M. P.; MORA *et al.* Detection of *pap*, *sfa* and *afa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. **Research in Microbiology**. v. 148, p. 745-755, 1997 (a).

BLANCO, M.; BLANCO, J. E.; RODRIGUEZ, E.; ABALIA, I. *et al.* Detection of virulence genes in uropathogenic *Escherichia coli* by polymerase chain reaction (PCR): comparison with results obtained using phenotypic methods. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 31, p. 37-43, 1997(b).

BLUM, G.; OTT, M.; LISCHEWSKI, A.; RITTER, A.; IMRICH, H.; TSCHAPE, H.; HACKER, J. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. **Infection and Immunity**. vol. 62, p. 606–614, 1994.

BLUM, G.; FALBO, V.; CAPRIOLI, A.; HACKER, J. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha hemolysin from the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. **FEMS Microbiology Letters**. v. 126, p. 189-195, 1995.

BOYD, E. F.; HARTL, D. L. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 1159-1165, 1998.

CADIEUX, P. A.; BURTON, J. P.; DEVILLARD, E.; REID, G.; *Lactobacillus* by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Physiology and Pharmacology**. v. 60, p. 13-18, 2009.

CHUNG, A.; ARIANAYAGAM, M.; RASHID, P. Bacterial cystitis in women. **Aust. Fam. Physician**. v. 39, p. 295-298, 2010.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. v. 30, p. 40-44, 2010.

CONNELL, H.; AGACE, W.; KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.; MARILD, S.; SVANBORG, C. Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, p. 9827–9832, 1996.

CONNOLLY, A.; THORP, J. M. Jr. Urinary tract infections in pregnancy. **Urologic Clinics of North America**. v. 26, p.779–787, 1999.

COTA, E.; JONES, C.; SIMPSON, P.; ALTROFF, H.; ANDERSON, K. L.; DU MERLE L *et al*. The solution structure of the invasive tip complex from Afa/Dr fibrils. **Molecular Microbiology**. v. 62, p. 356–366, 2006.

DAROUICHE, R. O.; DONOVAN, W. H.; DEL TERZO, M.; THORNBLY, J. I.; RUDY, D. C.; HULL, R. A. Pilot trial of bacterial interference for preventing urinary tract infection. **Urology**. v. 58, p. 339–344, 2001.

DAVIS, J. M.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. **Infection and Immunity**. v. 73, p. 5301–5310, 2005.

DAVIS, J. M.; CARVALHO, H. M.; RASMUSSEN, S. B.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. **Infection and Immunity**. v. 74, p. 4401-4408, 2006.

DE LORENZO, V.; BINDEREIF, A.; PAW, B. H.; NEILANDS, J. B. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**. v. 165, p. 570-578, 1986.

DHAKAL, B. D.; KULESUS, R. R.; MULVEY M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 38, (S2): 2–11, 2008.

DITCHFIELD, M. R.; GRIMWOOD, S. D.; COOK, K.; POWELL, D. J.; SLOANE, H. R.; NOLAN, R.; DE CAMPO, T. M. J. F. Time course of transient cortical

scintigraphic defects associated with acute pyelonephritis. **Pediatric Radiology**. v. 32, p. 849–852, 2002.

DOBRINDT, U.; CHOWDARY, M. G.; KRUMBHOLZ, G.; HACKER, J. Genomes dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology and Immunology**. v.199, p. 145-154, 2010.

DONNENBERG, M. S.; WECH, R. A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In: MOBLEY, H. L. T. & WARREN, J. W., ed. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. **American Society for Microbiology Press**. p. 135-174, 1996.

DONNENBERG, M. S.; WHITTAM, T. S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107 p. 539-48, 2001.

DURANT, L.; METAIS, A.; SOULAMA-MOUZE, C.; GENEVARD, J.; NASSIF, X.; ESCAICH, S. Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 75, p. 1916-1925, 2007.

EMODY, L.; KERÉNYI, M.; NAGY, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. **International Journal Antimicrobial Agents**. vol. 22, (Suppl.): S29-S33, 2003.

ETO, D. S.; JONES, T. A.; SUNDSBAK, J. L.; MULVEY, M. A. Integrin mediated host cell invasion by type 1–Piliated Uropathogenic *Escherichia coli*. **Plos Pathogens**. v. 3, p. 949-961, 2007.

FALZANO, L.; FILIPPINI, P.; TRAVAGLIONE, S.; MIRAGLIA, A. G.; FABBRI, A.; FIORENTINI, C. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 blocks cell cycle G2/M transition in uroepithelial cells. **Infection and Immunity**. v. 74, p. 3765–3772, 2006.

FISCHBACH, M. A. et al. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. **Nature Chemical Biology**. v. 2, p. 132–138, 2006.

FOXMAN, B.; KI, M.; BROWN, P. Antibiotic resistance and pyelonephritis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, p. 281-283, 2007.

FRENCH, L. Urinary tract infection in woman. **Women's health**. v.6, p. 24-29, 2006.

GAL-MOR, O.;FINLAY, B. B. Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. **Cellular Microbiology**. v. 11, p. 1707-1719, 2006.

GIAMBOI-MIRAGLIA, A.; TRAVAGLIONE, S.; FILIPPINI, P.; FABBRI, A.; FIORENTINI, C.; FALZANO, L. A multinucleating *Escherichia coli* cytotoxin perturbs cell cycle in cultured epithelial cells. **Toxicology in Vitro**. v. 21, p. 235–239,2007.

GUIGNOT, J. ; BERNET-CAMARD, M. F. ; POUS, C. ; PLANCON, L. ; LE BOUGUENEC, C. ; SERVIN, A. L. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for alpha5beta1 integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. **Infection and Immunity**. v. 69, p.1856–1868, 2001.

GUPTA, K.; STAMM, W. E. Urinary tract infections. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 7, p. 1-14, 2008.

GUYER, D. M.; HENDERSON, I. R.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. v. 38, p. 53–66, 2000.

HACKER, J.; KESTLER, H.; HOSCHU"TZKY, H.; JANN, K.; LOTTSPEICH, F.; KORHONEN, T. K. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. **Infection and Immunity**. v. 61, p. 544–550, 1993.

HACKER, J.; BLUM, G. O.; MUHLODORFER, I.; TSCHAPE, H. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function, and impact on microbial evolution. **Molecular Microbiology**. v. 23, p.1089–1097, 1997.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. v.41, p.95-98, 1999.

HOOTON, T. M.; STAMM, W. E. Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 11, p. 551-581, 1997.

HORCAJADA, J. P.; SOTO, S.; GAJEWSKI, A.; SMITHSON, A. et al. Quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* strains from phylogenetic group B2 have fewer virulence factors than their susceptible counterparts. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, p. 2962–2964, 2005.

JOHNSON, J. R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 4, p. 80-128, 1991.

JOHNSON, J. R. Microbial virulence determinantes and the pathogenesis of urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 17, p. 261-272, 2003.

JOHNSON, J. R.; STELL, A. L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. **Journal of Infections Diseases**. v. 181, p. 261-272, 2000.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; JOHNSON, S. J.; STELL, A. L.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, J. R.; KIM, K. S.; SPANJAARD, L.; NOLAN, L. K. Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. **Applied Environmental Microbiology**. v. 74, p. 7043-7050, 2008.

JONES, C. H.; PINKNER, J. S.; ROTH, HEUSER, J.; NICHOLAS, A. V.; ABRAHAM, S. N.; HULTGREN, S. J. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.** v. 92, p. 2081-2085, 1995.

JUSTICE S, HUNSTAD D, SEED P, HULTGREN S. Filamentation by *Escherichia coli* subverts innate defenses during urinary tract infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**. v. 03, p. 19884–19889, 2006.

KAHLMETER, G.; MENDAY, P.; CARS, O. Non-hospital antimicrobial usage and resistance in community-acquired *Escherichia coli* urinary tract infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 1005–1010, 2003.

KAO, J.; STUCKER, D. M.; WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenicity island sequences of pyelonephritogenic *Escherichia coli* CFT073 are associated with virulent uropathogenic strains. **Infection and Immunity**. v. 65, p. 2812-2820, 1997.

KAPER, J. B. NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 123–140, 2004.

KHAN, A. S.; KNIEP, B.; OLSCHLAGER, T. A.; VAN DIE, I.; KORHONEN, T. K.; HACKER, J. Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 3541–3547, 2000.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M. A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 290, p. 27–35, 2000.

KORHONEN, T. K.; VALTONEN, M. V.; PARKKINEN, J.; VAISANEN-RHEN, V.; J. FINNE, J.; OYRSKOV, I. ; OYRSKOV, F. ; SVENSON, S. B. ; MAKELA, P. H. Serotype, hemolysin production, and receptor recognition of *Escherichia coli* strains associated with neonatal sepsis and meningitis. **Infection and Immunity**. v. 48, p. 486–491, 1985.

KROGFELT, K. A.; BERGMANS, H.; KLEMM, P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. **Infection and Immunity**. v. 58, p. 1995–1999, 1990.

LANDRAUD, L.; GAUTHIER, M.; FOSSE, T.; BOQUET, P. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. **Letters in Applied Microbiology**. v. 30, p. 213-216, 2000.

LANGERMANN, S.; PALASZYNSKI, S.; BARNHART, M.; AUGUSTE, G.; PINKNER, J. S.; BURLEIN, J.; BARREN, P.; KOENIG, S.; LEATH, S.; JONES, C. H.; HULTGREN, S. J. Prevention of Mucosal *Escherichia coli* Infection by FimH-Adhesin-Based Systemic Vaccination. **Science**. v. 276, p. 607-611, 1997.

LEMONNIER, M. et al. Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 31, p. 515–534, 2007.

LERM, M.; SCHMIDT, G.; GOEHRING, U. M.; SCHIRMER, J.; AKTORIES, K. Identification of the region of Rho involved in substrate recognition by

Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1). **Journal of Biological Chemistry**. v. 274, p. 28999–29004, 1999.

LEYING, H.; SUERBAUM, S.; KROLL, H. P.; STAHL, D.; OPFERKUCH, W. The capsular polysaccharide is a major determinant of serum resistance in K-1-positive blood culture isolates of *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 58, p. 222-227, 1990.

LLOYD, A. L.; HENDERSON, T. A.; VIGIL, P. D.; MOBLEY, H. L.T. Genomic Islands of Uropathogenic *Escherichia coli* Contribute to Virulence. **Journal of Bacteriology**. v. 191, p. 3469-3481, 2009.

LÓPEZ, E.; ELEZ, M.; MATIC, I.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotic-mediated recombination: ciprofloxacin stimulates SOS-independent recombination of divergent sequences in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**. v. 64, p. 83–93, 2007.

MAHON, C. R.; MANUSELIS, G, JR. **Textbook of Diagnostic Microbiology**. cap. 31, p. 949- 968, 1995.

MACKMAN, N.; NICAUD, J. M.; GRAY, L. Secretion of haemolysin by *Escherichia coli*. **Current Topics in Microbiology and Immunology**. v. 125, p. 159-181, 1986.

MARRS, C. F.; ZHANG, L.; TALLMAN, P.; MANNING, S. D. *et al.* Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 51, p. 138-142, 2002.

MARRS, C. F. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? **FEMS Microbiology Letters**. v. 252, p. 183–190, 2005.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; FERNANDÉZ, F.; PEREA, E. J. Relationship between haemolysis production and resistance to fluoroquinolones among clinical isolates of *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 43, p. 277-279, 1999.

MARTINEZ, J.J.; MULVEY, M. A.; SCHILLING, J. D.; PINKNER, J. S.; HULTGREN, S. J.; Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. **EMBO Journal**. v. 19, p. 2803-2812, 2000.

MELLATA, M.; DHO-MOULIN, M.; DOZOIS, C. M. ; CURTISS R.; BROWN, P. K.; ARNE, P.; BREE, A. ; DESAUTELS, C. ; FAIRBROTHER, J. M. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 536–540, 2003.

MILLS, M. et al. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. **Infection and Immunity**. v. 68, p. 5869–5880, 2000.

MORENO, E.; PRATS, G.; SABATÉ, M.; PÉREZ, T.; JOHNSON, J. R.; ANDREU, A. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence determinants and phylogenetic background amount uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 204-211, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v. 65. p. 55-63, 1983.

MUHLDOERFER, I.; HACKER, J. Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. **Microbial Pathogenesis**. v. 16, p. 171–181, 1994.

MUHLDOERFER, I.; ZIEBUHR, W.; HACKER, J. *Escherichia coli* in urinary tract infections. In: Sussman M, editor. Molecular Med Microbiology. London: **Academic Press**. p. 1739–1748, 2001.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; PFALLER, M.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. In: Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Microbiology**. p. 442-455, 1999.

NABER (CHAIRMAN), K. G.; BISHOP, M. C.; BJERKLUND-JOHANSEN, T. E.; BOTTO, H.; ÇEK, M.; GRABE, M.; LOBEL, B.; PALOU, J.; TENKE, P. The management of urinary and male genital tract infections. **European Association of Urology**. p. 7-123, 2006.

NAJAR, M. S.; SALDANHA, C. L.; BANDAY, K. A. Approach to urinary tract infections. **Indian Journal of Nephrology**. v. 19, p. 129-139, 2009.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Patogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**. v. 2, p. 123-140, 2004.

NICOLLE, L. E. Urinary tract pathogens in complicated infection and in elderly individuals. **Journal of Infection Diseases**. v. 183, Suppl 1: S5-8, 2001.

NICOLLE, L. E.; MADSEN, K. S., DEBEECK, G. O. et al. Three days of pivmecillinam or norfloxacin for treatment of acute uncomplicated urinary infection in women. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**. v. 34, p. 487-92, 2002.

NORRBY, S. R. Short-term treatment of uncomplicated lower urinary tract infections in women. **Reviews of Infectious Diseases**. v. 12, p. 458-67, 1990.

NOWICKI, B.; SELVARANGAN, R.; NOWICKI, S. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. **Journal of Infectious Diseases**. v. 183, (Suppl. 1):S24-7, 2001.

OELSCHLAEGER, T. A.; DOBRINDT, U.; HACKER, J. Virulence factors of uropathogens. **Current opinion in Urology**. v. 12, p. 33-38, 2002.

OLSON, M. F.; ASHWORTH, A.; HALL, A. An essential role for Rho, Rac and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. **Science**. v. 269, p.1270-1272, 1995.

OSTOLAZA, H.; GONI, F. M. Interaction of the bacterial protein toxin alpha-haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity. **FEBS Letters**. v. 371, p. 303-306, 1995.

OSWALD, E.; NOUGAYRE`DE, J. P.; TAIEB, F.; SUGAI, M. Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. **Current Opinion in Microbiology**. v. 8, p. 83-91, 2005.

PAK, J.; PU, Y.;ZHANG, Z. T.;HASTY, D. L.;WU, X. R. 2001. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin Ia and Ib receptors. **Journal of Biological Chemistry**. v. 276, p. 9924-9930, 2001.

PETTIGREW, D.; ANDERSON, K. L.; BILLINGTON, J. et al. High resolution studies of the Afa/Dr adhesion DraE and its interaction with chloramphenicol. **Journal of Biological Chemistry**. v. 279, p. 46851–46857, 2004.

PIATTI, G.; MANNINI, A.; BALISTRERI, M.; SCHITO, A. M. Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p.480–487, 2008.

RAGNARSDÓTTIR, B.; FISCHER, H.; GODALY, G.; GRÖNBERG-HERNANDEZ, J.; GUSTAFSSON, M.; KARPMAN, D.; LUNDSTEDT, A. C.; LUTAY, N.; RÄMISCH, S.; SVENSSON, M. L.; WULLT, B.; YADAV, M.; SVANBORG, C. TLR- and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of urinary tract infections. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 38, p. 12-20, 2008.

RASKO, D. A.; PHILLIPS, J. A.; LI, X.; MOBLEY, H. L. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073; probes specific for uropathogenic populations. **Journal of Infection Diseases**. v. 184, p.1041-1049, 2001.

REN, X. D.; KIOSSES, W. B.; SCHWARTZ, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. **EMBO Journal**. v. 18, p. 578–585, 1999.

RIPPERE-LAMPE, K. E.; LANG, M.; CERI, H.; OLSON, M.; LOCKMAN, H. A.; O'BRIEN, A. D. Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 6515–6519, 2001a.

RIPPERE-LAMPE, K.E., O'BRIEN, A.D., CONRAN, R., LOCKMAN, H.A., 2001b. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**. v. 69, p. 3954–3964, 2001b.

ROOS, V.; ULETT, G. C.; SCHEMBRI, M. A.; KLEMM, P. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. **Infection and Immunity**. v. 74, p. 615-624, 2006.

RUSSO, T. A.; CARLINO, U. B.; MONG, A.; JODUSH, S. T. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression

after exposure to human urine. **Infection and Immunity**. v. 67, p.5306–5314, 1999.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. **Journal of Infectious Diseases**. v. 181, p.1753–1754, 2000.

SALYERS, A. A.; WHITT, D. D. Bacterial pathogenesis: a molecular approach. cap. 3, p. 30-46, 2002.

SAMBROOK, I.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning– A laboratory manual**. 2 ed. New York: CSH, 1989.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 1977.

SANTO, E.; MACEDO, C.; MARIN, J. M. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* from a university hospital in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 48, p.185-188, 2006.

SANTOS, A. C. M.; PIGNATARI, A. C. C.; SILVA, M. R.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extraintestinal (ExPEC) com relação à idade e sexo do hospedeiro. **O mundo da saúde**. v. 33, p. 392-400, 2009.

SAUER, F. G.; PINKNER, J. S.; WAKSMAN, G.; HULTGREN, S. J. Chaperone priming of pilus subunits facilitates a topological transition that drives fiber formation. **Cell**. v. 111, p. 543–551, 2002.

SCALETSKI, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distintive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**. v. 45, p. 534-536, 1984.

SCALETSKI, I. C.; PEDROSO, M. Z.; SILVA, R. M. Phenotypic and genetic features of *Escherichia coli* strains showing simultaneous expression of localized and diffuse adherence. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 23. p. 181-188, 1999.

SCHAEFFER, A. J. What do we about the urinary tract infection- prone individual? **Journal of Infection Diseases.** v. 183 (Supl 1): S66-9, 2001.

SCHHEFFER, J.; KONIG, W.; BRAUN, V.; GOEBEL, W. Comparison of four hemolysin-producing organisms (*Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes*) for release of inflammatory mediators from various cells. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 26, p. 544 – 551, 1988.

SCHMIDT, G.; SELZER, J.; LERM, M.; AKTORIES, K. The Rho-deamidating cytotoxic necrotizing factor 1 from *Escherichia coli* possesses transglutaminase activity: cysteine 866 and histidine 881 are essential for enzyme activity. **Journal of Biological Chemistry.** v. 273, p. 13669–13674, 1998.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 17, p. 14-56, 2004.

SCHRIER, R. W. The patient with urinary tract infection. In: REDINGTON, J.; RELLER, B. L. **Manual of Nephrology.** Lippincott Williams and Wilkins. p. 91–113, 2000.

SEARS, C. L.; KAPER, J. B. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. **Microbiology Reviews.** v. 60, p. 167–215, 1996.
SERVIN, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews.** v. 18, p. 264–292, 2005.

SIITONEN, A. What makes *Escherichia coli* pathogenic? **Annals of Medicine.** v. 26, p. 229-231, 1994.

SILVEIRA, W. D.; BENETTI, F.; LANCELLOTTI, M.; FERREIRA, A.; SOLFERINI, V. N.; BROCCHI, M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 43, p. 303-310, 2001.

SMITH, H. W. The hemolysins of *Escherichia coli*. **Journal of Pathol. Bacteriol.** v. 85, p. 197-211, 1963.

SMITH, Y. C.; RASMUSSEN, S. B.; GRANDE, K. K.; CONRAN, R. M.; O'BRIEN, A. D. Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first

24 Hours after intraurethral inoculation of mice. **Infection and Immunity**. v. 76, p. 2978-2990, 2008.

SNYDER, I. S., KOCH, N. A. Production and characteristics of hemolysins of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**. v. 91, p. 763-76, 1966.

SNYDER, J. A.; HAUGEN, B. J.; BUCKLES, E. L.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S.; WELCH, R. A.; MOBLEY, H. L. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. **Infection and Immunity**. v. 72, p. 6373–6381, 2004.

SOBEL, J. D.; DONALD, K. Urinary tract infection. In: MANDELL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Elsevier Inc., Philadelphia, p. 875-883, 2005.

SOTO, S. M.; JIMENEZ DE ANTA, M. T.; VILA, J. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. **Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 50, p. 649–653, 2006.

STAMM, W. E. Host-pathogen interactions in community-acquired urinary tract infections. **Transactions of the American clinical and climatological association**. v. 117, p. 75-84, 2006.

STAMM, W. E.; STAPLETON, A. E. Approach to the patients with urinary tract infection. **Journal of Infectious Diseases**. p. 861-872, 2004.

STAPLETON, A.; HOOTON, T. M.; FENNELL, C.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Effect of secretor status on vaginal and rectal colonization with fecal *Escherichia coli* in women with and without recurrent urinary tract infection. **Journal of Infectious Diseases**. v. 171, p. 717, 1995.

SVANBORG, E.; HAGBERG, L.; HANSON, L. A.; HULL, S.; HULL, R.; JODAL, U.; LEFFLER, H.; LOMBERG, H.; STRAUBE, E. Bacterial adherence a pathogenic mechanism in urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. **Progress in Allergy**. v. 33, p. 175-188, 1983.

SVANBORG, E. C.; GODALY, G. Bacterial virulence in urinary tract infection. **Infectious Disease Clinics North America**. v. 11, p. 513-529, 1997.

SVENSON, S. B.; KÄLLENIUS, G.; MÖLLBY, R.; HULTBERG, H.; KORHONEN, T. K.; WINBERG, J. P-fimbriae of pyelonephritogenic *Escherichia coli*: Identification and chemical characterization of receptors. **Infection**. v. 11, p. 61-67, 1983.

SWENSON, D. L.; BUKANOV, N. O.; BERG, D. E.; WELCH, R. A. Two Pathogenicity Islands in Uropathogenic *Escherichia coli* J96: Cosmid Cloning and Sample Sequencing. **Infection and Immunity**. v. 64, p. 3736-3743, 1996.

TABIBIAN, J. H.; GORNBEIN, J.; HEIDARI, A.; DIEN, S. L.; LAU, V. H.; CHAHAL, P.; CHURCHILL, B. M.; HAAKE, D. A. Uropathogens and host characteristics. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, p. 3980-3986, 2008.

TAKAHASHI, A.; KANAMARU, S.; KURAZONO, H.; KUNISHIMA, Y. *et al.* *Escherichia coli* isolates associated with uncomplicated and complicated cystitis and asymptomatic bacteriuria possess similar phylogenies, virulence genes, and O-serogroup profiles. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, p. 4589-4592, 2007.

TAKAHASHI, A.; MURATANI, T.; YASUDA, M.; TAKAHASHI, S. *et al.* Genetic profiles of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates obtained from patients with cystitis: phylogeny, virulence factors, *PAI* subtypes, and mutation patterns. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, p. 791-795, 2009.

THANKAVEL, K.; MADISON, B.; IKEDA, T.; MALAVIYA, R.; SHAH, A. H.; ARUMUGAM, P. M.; ABRAHAM, S. N. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 100, p. 1123, 1997.

TIBA, M. R.; YANO, T.; LEITE, D. S. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 50, p. 255-260, 2008.

THOMPSON, J. D., HIGGINS, D. G., GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. v.22, n.22, p.4673-4680, 1994.

TRAUTNER, B. W.; HULL, R. A.; DAROUICHE, R. O. *Escherichia coli* 83972 inhibits catheter adherence by a broad spectrum of uropathogens. **Urology**. v. 61, p.1059–1062, 2003.

VAN LOY, C. P.; SOKURENKO, E. V.; MOSELEY, S. L. The major structural subunits of Dr and F1845 fimbriae are adhesins. **Infection and Immunity**. v. 70, p.1694–1702, 2002a.

VAN LOY, C. P.; SOKURENKO, E. V.; SAMUDRALA, R.; MOSELEY, S. L. Identification of amino acids in the Dr adhesion required for binding to decay-accelerating factor. **Molecular Microbiology**. v. 45, p. 439–452, 2002b.

VILA, J.; SIMON, K.; RUIZ, J.; HORCAJADA, J. P. et al. Are quinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* less virulent? **Journal of Infectious Diseases**. v. 186, p. 1039–1042, 2002.

VILLALONGA, P.; RIDLEY, A. J. Rho GTPases and cell cycle control. **Growth Factors** 24, p.159–164, 2006.

VON BAUM, H.; MARRE, R. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 295, p. 503-511, 2005.

WAGENLEHNER, F. M.; [NABER, K. G.](#) New Gram-positive uropathogens. **International Journal Antimicrobial Agents**. v. 24, p. 39-43, 2004.

WALSH, P. C.; RETIK, A. B.; VAUGAN, E. D.; WEIN, A. J. **Campbell's Urology**. 8 ed., v. 1, p. 513-590, 2002.

WARREN, J. W.; MOBLEY, H. L.; TRIFILLIS, A. L. Internalization of *Escherichia coli* into human renal tubular epithelial cells. **Journal of Infectious Diseases**. vol. 158, p. 221-223, 1988.

WELCH, R. A.; BAUER, M. E.; KENT, A. D.; LEEDS, J. A.; MOAVERI, M.; REGASSA, L. B.; SWENSON. Battling against host phagocytes: the wherefore of the RTX family of toxins? **Journal of Infectious Agents Diseases**. v. 4, p. 254-272, 1995.

WELCH, R.A.; BURLAND, V.; PLUNKETT III, G.; REDFORD, P.; ROESCH, O.; RASKO, D.; BUCKLES, E. L.; LIOU, S. R.; BOUTIN, A.; HACKETT, J.;

STROUD, D.; MAYHEW, G.F.; ROSE, D. J.; ZHOU, S.; SCHARTZ, D. C.; PERNA, N. T.; MOBLEY, H. L.; DONNENBERG, M. S.; BLATTNER, F. R. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 99, p. 17020-17024, 2002.

WILES, T. J.; KULESUS, R. R.; MULVEY, M. A. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**. v. 85, p. 11–19, 2008.

WRIGHT, K. J.; SEED, P. C.; HULTGREN, S. J. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. **Cellular Microbiology**. v. 9, p. 2230–2241, 2007.

WU, X. R.; SUN, T. T.; MEDINA, J. J. *In vitro* binding of type 1-fimbriated *Escherichia coli* to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 93, p. 9630–9635, 1996.

WULLT, B.; BERGSTEN, G.; SAMUELSSON, M.; GEBRETSADIK, N.; HULL, R.; SVANBORG, C. The role of P fimbriae for colonization and response induction in the human urinary tract. **Journal of Infection Diseases**. v. 183(Suppl 1):S43-46, 2001.

YAMAMOTO, S.; TERA, A.; YURI, K.; KURAZONO, H.; TAKEDA, Y.; YOSHIDA, O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 12, p. 85-90, 1995.

YAMAMOTO, S. Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Infection and Chemotherapy**. v. 13, p. 68-73, 2007.

YAN, F.; POLK, D. B. Commensal bacteria in the gut: learning who our friends are. **Current Opinion in Gastroenterology**. v. 20, p. 565–571, 2004.

ZHANG, L.; FOXMAN, B. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. **Frontiers in Bioscience**. v. 8, p. 235–244, 2003.

ZORC, J.J.; KIDDOO, D. A.; SHAW, K. N. Diagnosis and management of pediatric urinary tract infections. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, p. 417-422, 2005.

ANEXO 1

TABELA 12. Sequências do GenBank que produziram alinhamentos significativos com os amplicons de UPEC.

Estirpe / Gene	Homologia	Score	Valor de e	Identidade
UPEC2, gene <i>traT</i> seq24790	E.coli -Plasmid R100 complement resistance (<i>traT</i>) gene - acesso J01769.1	444	9e-122	100%
UPEC2, gene <i>aer</i> seq 24793	E. coli strain A2363 plasmid pTJ100 iron acquisition operon acesso AY553855	578	9e-162	95%
UPEC2, gene <i>aer</i> seq 24793	Escherichia coli ED1a chromosome, complete genome; L-lysine 6-monooxygenase (Lysine N(6)-hydroxylase)	632	5e-178	98%
UPEC2, gene <i>hly</i> seq 24794	Escherichia coli CFT073, complete genome AE014075.1 Hemolysin A	713	0.0	99%
UPEC3, gene <i>sfa</i> seq 24796	Escherichia coli encoding determinant <i>sfa</i> (I) Acesso X16664.4	589	5e-165	98%
EC71, gene <i>afa</i> seq24797	Escherichia coli <i>afa</i> operon, strain FV9863 gi 218921795 Acesso FM955458	641	0.0	98%
UPEC3, PAI seq24799	Escherichia coli CFT073 antiterminator homolog and MalX homolog genes, complete cds gi2197102	601	8e-169	97%
UPEC3, gene <i>cnf1</i> seq24803	Escherichia coli isolate 5383-2 cytotoxic necrotizing factor 1 (<i>cnf1</i>) AF483829.1	652	0.0	98%
UPEC2, gene <i>pap</i> seq 23417	Escherichia coli UMN026 chromosome, complete genome Fimbrial adapter PapF precursor gi218430358	360	4e-86	97%

Figura 7. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 2 que apresentou tamanho esperado para o gene *traT* (seq 24790) com uma região do Plasmideo R100 de *E. coli* que codifica *traT*.

```
seq24790          TCAAAAACACGTCTGATAAAGACATGAGTGGGCTGCAGGGCAAAATTGCT 50
gi |151786|gb|J01769.1|R10TRAT TCAAAAACACGTCTGATAAAGACATGAGTGGGCTGCAGGGCAAAATTGCT 50
*****

seq24790          GATGCTGTGAAAGCAAAAGGATATCAGGTGGTGACTTCTCCGGATAAAGC 100
gi |151786|gb|J01769.1|R10TRAT GATGCTGTGAAAGCAAAAGGATATCAGGTGGTGACTTCTCCGGATAAAGC 100
*****

seq24790          CTACTACTGGATTCAGGCGAATGTGCTGAAGGCCGATAAGATGGATCTGC 150
gi |151786|gb|J01769.1|R10TRAT CTACTACTGGATTCAGGCGAATGTGCTGAAGGCCGATAAGATGGATCTGC 150
*****

seq24790          GGGAGTCTCAGGGATGGCTGAACCGT 176
gi |151786|gb|J01769.1|R10TRAT GGGAGTCTCAGGGATGGCTGAACCGT 176
*****
```

Figura 8. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 2 que apresentou tamanho esperado para o gene *aer* (seq 24793) com uma região do plasmideo pTJ100 de *E. coli* estirpe A2363 que codifica um operon de aquisição de ferro.

```
gi |45505231|gb|AY553855.1| GTTGCACCTACAAATCCCTACAGTTTTGTAACTATCTGGTGAAGCACAA 50
Seq 24793 GTTGCACCTACAAATCCCTACAGTTTTGTAACTATCTGGTGAAGCACAA 50
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| AAAGTTCTATCGCTTCCTTACAAGCAGACTACGTACAGTATCCCGTGAAG 100
Seq 24793 AAAGTTCTATCGCTTCCTTACCAGCAGGCTACGTACAGTATCCCGTGAAG 100
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| AGTTTTCTGACTACCTCCGCTGGGCTGCTGAAGATATGAATAACCTGTAT 150
Seq 24793 AGTTTTCTGACTATCTCCGCTGGGCTGCTGAAGATATGAATAACCTGTAT 150
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| TTCAGTCATACCGTTGAAAACATTGATTTTCGATAAAAAACGTCGATTGTT 200
Seq 24793 TTCAGTCATACCGTTGAAAATATTGATTTTCGACAAAAAAGTCGATTGTT 200
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| TCTGGTGCAAACCAGCCAGGGAGAATATTTGCCCGCAATATCTGCCTTG 250
Seq 24793 TCTGGTTTCAGACCAGTCGGGGAGAATATTTGCCCGNAATATCTGCCTTG 250
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| GTACAGGAAAACAACCTTATTTACCACCCTGTGTGAAGCATATGACACAA 300
Seq 24793 GTACAGGAAAACAACCTTATTTACCACCCTGTGTGAAGNATGTGACACAA 300
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| TCCTGTTTCCATGCCAGTGAATGAATCTTCGTCGGCCGGACCTTAGTGG 350
Seq 24793 TCCTGTTTCCATGCCAGTGAATGAATCTTCGTCGGCCGGACCTGAGTGA 350
*****

gi |45505231|gb|AY553855.1| AAAACGGAT 359
Seq 24793 AAAACGGAT 359
*****
```

Figura 9. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 2 que apresentou tamanho esperado para o gene *hly* (seq 24794) com uma região do genoma de *E. coli* CFT073, codificando a Hemolisina A.

```

gi|26111730_3418896-3421970      CGGTAAGCGCGCTGGTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTTCAGGCATCCTT 50
seq 24794                        CGGTAAGCGCGCTGGTAGGGGCTGTTACGGGGATAATTTTCAGGCATCCTT 50
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      GAGGCTTCAAACAGGCAATGTTTGAACATGTCGCCAGTAAATGGCCGA 100
seq 24794                        GAGGCTTCAAACAGGCAATGTTTGAACATGTCGCCAGTAAATGGCCGA 100
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      TGTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAAAATTACTTTGAAAATG 150
seq 24794                        TGTATTGCTGAATGGGAGAAAAACACGGCAAAAATTACTTTGAAAATG 150
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      GATATGATGCCCGCATGCTGCATTTTGTAGAAGATAACTTTAAATATTA 200
seq 24794                        GATATGATGCCCGCATGCTGCATTTTGTAGAAGATAACTTTAAATATTA 200
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTGTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCA 250
seq 24794                        TCTCAGTATAATAAAGAGTATTCTGTGTGAAAGATCAGTCCTCATTACCCA 250
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      GCAACATTGGGATACGCTGATAGGTGAGTTAGCGGGTGTCACCAGAAATG 300
seq 24794                        GCAACATTGGGATACGCTGATAGGTGAGTTAGCGGGTGTCACCAGAAATG 300
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      GAGACAAAACACTCAGTGGTAAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGA 350
seq 24794                        GAGACAAAACACTCAGTGGTAAAAGTTATATTGACTATTATGAAGAAGGA 350
                                *****

gi|26111730_3418896-3421970      AAACGCTCTGGAGAAAAACCGGATGAATTCCAGAAGCAAGTCTTTGA 397
seq 24794                        AAACGCTCTGGAGAAAAACCGGATGAATTCCAGAAGCAAGTCTTTGA 397
                                *****

```

Figura 10. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 3 que apresentou tamanho esperado para o gene *sfa* (seq 24796) com uma região do genoma de *E. coli* codificando *sfa*(I)

```

gi X16664.4      CACACATTATCCCGTCGCCGGGGAAAGGCAATGGACAGGTATGGTTTTCTCTGACCTA 60
seq 24796        CACACATTATCCCGTCACCGGGGGAAAGGCAATGGACAGGTATGGTTTTCTCTGACCTA 60
                *****

gi X16664.4      TCTGTAAGTGGCAGATATAATGCCATTTAATTAAGGCTGTTAATAACATGATGAAGCACA 120
seq 24796        TCTGTAAGTGGCAGATATAACGCCATTTAATTAAGGCTGTTAATAACATGATGAAGCACA 120
                *****

gi X16664.4      TCGGTATATGGGCCGTTCTGGCATCATTTTTAGTCTTTTTTTATATTCCGCAGAGCTATG 180
seq 24796        TCGGTATATGGGCCGTTCTGGCATCATTTTTAGTCTTTTTTTATATTCCGCAGAGCTATG 180
                *****

gi X16664.4      CCGGGGTTGCTCTGGGTGCCACCCGTGTGATTTACCTGAAGGGCAAAACAGGTACAAC 240
seq 24796        CCGGGGTTGCTCTGGGGGCCACCCGTGTGATTTACCTGAAGGGCAAAACAGGTACAAC 240
                *****

gi X16664.4      TGGCGGTAACAAATAATGATGATAAAAGTAGTTACCTTATTTCAGTCATGGATTGAAAATG 300
seq 24796        TGGCGGTAACAAATAATGATGATAAAAGTAGTTACCTTATTTCAGTCATGGATTGAAAATG 300
                *****

gi X16664.4      CTGAAGGAAAAAAGGATGCCAGGTTTGTAATTACTC 335
seq 24796        CTGAGGGAAAAAAGGATGCCAGGTTTGTAATTACTC 336
                ****

```

Figura 11. Alinhamento do produto de amplificação da EC71 que apresentou tamanho esperado para o gene *afa* (seq 24797) com uma região do genoma de *E. coli* estirpe FV9863 que codifica o operon *afa*.

```

seq 24797      TTCAGGGCGGATGAGAACGGGGTTGACAGGGCTGGCGCTGGCTGTGATGNTGGCCTGTGT 60
gi 218921795  TTCAGGGCGGATGAAAACGGGGGTGACAGGGCTGGCGCTGGCTGTGATGGTGGCCTGTGT 60
*****.*****

seq 24797      GATGTTTCGTGCGGAGAGTGGTATTGCGCGCACCTACTCCTTTGATGCGGCCATGCTGAA 120
gi 218921795  GATGTTTCGTGCGGAGAGTGGTATTGCGCGCACCTACTCCTTTGATGCGGCCATGCTGAA 120
*****

seq 24797      AGGTGGCGG-AAGGGGGTGGACCTGACCCTGTTTGAGGAAGGTGGGCAGTTACCCGGCAT 179
gi 218921795  AGGTGGCGGTAAGGGGGTGGACCTGACCCTGTTTGAGGAAGGTGGGCAGTTACCCGGCAT 180
*****

seq 24797      TTATCCGGTTGACATTATCCTGAATGGTTCCCGTGTGGATTACAGGAGATGGCCTTTCA 239
gi 218921795  TTATCCGGTTGACATTATCCTGAATGGTTCCCGTGTGGATTACAGGAGATGGCCTTTCA 240
*****

seq 24797      CGCGGAGAGGGACGCGGAGGGCAGGCCTTATCTGAAGACCTGTCTGACCCGTGAGATGCT 299
gi 218921795  CGCGGAGAGGGACGCGGAGGGCAGGCCTTATCTGAAGACCTGTCTGACCCGTGAGATGCT 300
*****

seq 24797      GGCGCGTTACGGGGTCAGGATTGAGGAATATCCGGCGTTGTTCCGTGCATCCGGAGAGGG 359
gi 218921795  GGCGCGTTACGGGGTCAGGATTGAGGAATATCCGGCGTTGTTCCGTGCATCCGGAGAGGG 360
*****

seq 24797      TCGTGGT 366
gi 218921795  TCGTGGT 367
*****

```

Figura 12. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 3 que apresentou tamanho esperado para o gene *PAI* (seq 24799) com uma região do genoma de *E. coli* CFT073 que codifica "antiterminator homolog and MalX homolog"

```

gi2197102     CTTTTATCTTAAACAGCAGCACTTATTGGTCGTTGCTGACCAAATGTCGACACATGGGCA 60
seq24799      CTTTTATCTTANACAGCAGCACTTATTGTTCNTTGTGACCAAATGTCGACACATGGCCA 60
*****

gi2197102     AACCATCATTTCTGGGGATCCAGTCCTACAATACCAGCGTGTGGGGGGAATTGTTGCTGG 120
seq24799      AACCATCATTTNTGGGGATCCAGTCNTACAATACAAGCGTGTGGGGGGAATTGTTGCTGG 120
*****

gi2197102     GTTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAAAGATCGTTAATTTACGCATTCTCGAATCGTTAGG 180
seq24799      GTTATTAGTCGCCAGCATGTATAAAAAGATCGTTAATTTACGCATTCCAGAATCATTAGG 180
*****

gi2197102     TTCTTATAGCGGCCACGTCTGGTGCCTATCATTACACTGATTGTGATGAGTGGATTGG 240
seq24799      TTTTATAGCGGCCACGTCTGGTGCCTATCATTACACTGATTGTGATGAGTGGATTGG 240
**

gi2197102     TCTGATCATTCCTTTTATCTGGCCGCCGTTTTCATCTTTTCATGCTCATTGGACACTG 300
seq24799      TCTGATCATTCCTTTAATCTGGCCGCCGTTTTCATCTTTTCATGCTCATTGGACACTG 300
*****

gi2197102     GATTTCAACTTCCGGTCCTGTTGGTTATTTCTTCTATGCAGTTGCCGAACGCTGACGAT 360
seq24799      GATTTCAACTTCCGGTCCTGTTGGTTATTTCTTCTATGCAGTTGCCGAACGCTGACGAT 360
*****

gi2197102     T 361
seq24799      T 361
*

```


Figura 13. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 3 que apresentou tamanho esperado para o gene *cnf1* (seq 24803) com uma região do genoma de *E. coli* isolado 5383-2 que codifica o fator necrotizante citotóxico.

```

seq24803      GATGGAGTTTCCTATGCAGGAGTAAATTCAGTTCTACATGCAATAGAAAATGATGGTAAT 60
gi22652648    GATGGAGTTTCCTATGCAGGAGTAAATTCAGTTCTACATGCAATAGAAAATGATGGTAAT 60
*****

seq24803      TTTAATGAGTCTTACTTTTCTGTATTCCAATAAGACACTNAGCAATAAAGATGTTTTTGAT 120
gi22652648    TTTAATGAGTCTTACTTTTCTGTATTCCAATAAGACACTTAGCAATAAAGATGTTTTTGAT 120
*****

seq24803      GCTATAGCTATTTCTGTAAAGAAACGCAGTTTCAGTGATGGTGATATCGTTATAAAATCA 180
gi22652648    GCTATAGCTATTTCTGTAAAGAAACGCAGTTTCAGTGATGGTGATATCGTTATAAAATCA 180
*****

seq24803      AACAGTGAAGCTCAACGAGACTATGCTCTGACTATACTCCAGACGATTTTATCAATGACC 240
gi22652648    AACAGTGAAGCTCAACGAGACTATGCTCTGACTATACTCCAGACGATTTTATCAATGACC 240
*****

seq24803      CCTATATTTGATATCGTAGTCCCGGAGGTATCTGTTCCGCTTGNACTGGGGATTATTACT 300
gi22652648    CCTATATTTGATATCGTAGTCCCGGAGGTATCTGTTCCGCTTGGACTGGGGATTATTACT 300
*****

seq24803      TCCAGTATGGGGATCAGTTTTTGATCAACTGATNAATGG-CATACTTANGAAGAACGTCGT 359
gi22652648    TCCAGTATGGGGATCAGTTTTTGATCAACTGATTAATGGTGATACTTATGAAGAACGTCGT 360
*****

seq24803      TCTGCTATACCTGGTT 375
gi22652648    TCTGCTATACCTGGTT 376
*****

```

Figura 14. Alinhamento do produto de amplificação da UPEC 2 que apresentou tamanho esperado para o gene *pap* (seq 23417) com uma região do cromossomo de *E. coli* UMN026 que codifica "[Fimbrial adapter PapF precursor](#)"

```

gi218430358   TTGTCCACGTGCTCAGGATTAATATTCCCAAAATCAACAACAATATTCTGCCCGTTATTA 60
seq23417       TTGTCCACGTGCTCAGGATTAATATTCCCAAAATCAACAACAATATTCTGCCCGTTATTA 60
*****

gi218430358   ATGGTGTCATGGGGGGATATAAACATTTCCCTGATGTTAATCTGCACATCAGCCAGTACA 120
seq23417       ATAGNGCATGGGGGGATATAAACATTTCCCTGATGCTAATCTGCACATCAGCCAGTACA 120
**.*.*****

gi218430358   GCGACCGATGTCAGAAGCAACGATATAAATAATGATAAACGAGCCATTCCCCCTCCGGAG 180
seq23417       GCGACCGATGTAAGAAGCAACGATATAAATNATGATAAACGAGTCATTCCCCCTCCGGAG 180
*****

gi218430358   AGCGGTACAGAAAA 194
seq23417       AGCGGTACAGAAAA 194
*****

```

